

Metabolische Modellierung thermophiler Prokaryoten

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Helge Sebastian Stark
aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. Dietmar Schomburg
2. Referent Prof. Dr. Dieter Jahn
eingereicht am: 26.04.2017
mündliche Prüfung (Disputation) am: 27.06.2017

Druckjahr 2017

Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

Publikationen

Stark, H., Wolf, J., Albersmeier, A., Pham, T. K., Hofmann, J. D., Siebers, B., Kalinowski, J., Wright, P. C., Neumann-Schaal, M. and Schomburg, D. (2017), Oxidative Stickland reactions in an obligate aerobic organism – amino acid catabolism in the Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. FEBS J, 284: 2078–2095.

Wolf, J., Stark, H., Fafenrot, K., Albersmeier, A., Pham, T. K., Müller, K. B., Meyer, B. H., Hoffmann, L., Shen, L., Albaum, S. P., Kouril, T., Schmidt-Hohagen, K., Neumann-Schaal, M., Bräsen, C., Kalinowski, J., Wright, P. C., Albers, S.-V., Schomburg, D. and Siebers, B. (2016), A systems biology approach reveals major metabolic changes in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* in response to the carbon source L-fucose versus D-glucose. Molecular Microbiology, 102: 882–908.

Posterbeiträge

Stark, H., Wolf, J., Müller, K., Albaum, S., Albersmeier, A., Pham, T.K., Schomburg, D. (2015), Systems biology reveals a novel L-fucose degradation pathway in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Poster präsentiert auf dem e:Bio Innovation Competition Systems Biology Status Seminar, Berlin, Deutschland.

Gewidmet meiner Lebenspartnerin Jacqueline Hermann

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	VI
Abstract.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Metabolische Modellierung.....	1
1.2 Genomannotationen.....	4
1.3 Anpassungsstrategien thermophiler Prokaryoten.....	4
1.4 <i>Thermus thermophilus</i>.....	6
1.5 <i>Sulfolobus solfataricus</i>.....	7
1.6 Ziel der Arbeit.....	8
2 Material und Methoden.....	9
2.1 Metabolische Modellierung.....	9
2.1.1 Repräsentation metabolischer Netzwerke.....	9
2.1.2 Einschränkungsbasierte Modellierung.....	10
2.1.3 Das metano-Softwarepaket.....	12
2.1.4 Informationsquellen und Datenbanken.....	13
2.1.5 Erweiterung der Ausgangsmodelle.....	14
2.1.6 Modell-Nomenklatur.....	15
2.1.7 Semi-automatische Genom-Annotation.....	16
2.2 Analyse der metabolischen Modelle.....	17
2.2.1 <i>Flux Balance Analysis</i>	17
2.2.2 <i>Flux Variability Analysis</i>	19
2.2.3 <i>Minimisation Of Metabolic Adjustment</i>	20
2.2.4 Thermodynamisch verbotene Zyklen.....	22
2.2.5 „ <i>Dead end</i> “-Analyse.....	23
2.2.6 Metabolitzentrische Flussanalyse.....	23
2.2.7 Metabolitfluss-Minimierung.....	24
2.3 Programmierung.....	24
2.3.1 Bestehende Software.....	25
2.3.2 Standardisierte Speicherung von Modellparametern.....	25
2.3.3 Erstellung einer Metabolitdatenbank.....	26

2.3.4 Automatisierte Erstellung von Szenarien.....	27
2.3.5 Automatisierte Graphenerstellung.....	28
2.3.6 Elementzentrische Flussanalyse.....	29
3 Ergebnisse und Diskussion.....	30
3.1 Entwicklung einer Modellierungsplattform.....	30
3.1.1 Klassenstruktur.....	33
3.1.2 Datenbankstruktur.....	35
3.1.3 Verbesserung der automatisierten Genomannotation.....	38
3.1.4 Bündelung von Metabolit-Informationen.....	38
3.1.5 Standardisierte Speicherung von Modellierungsparametern.....	39
3.1.6 Automatisierte Batch-Simulationen.....	40
3.1.7 Erweiterte Analysefunktionen.....	43
3.2 Modellierung von <i>Thermus thermophilus</i>.....	50
3.2.1 Erweiterung und Validierung des Modells.....	50
3.2.2 Charakterisierung des Stoffwechsels für verschiedene Kohlenstoffquellen.....	57
3.2.2.1 Glucose.....	58
3.2.2.2 Glycerol.....	67
3.2.2.3 Succinat.....	74
3.2.2.4 Phenylacetat.....	81
3.2.2.5 3-Hydroxybutanoat.....	89
3.2.3 Auswirkungen temperaturabhängiger Parameter.....	96
3.3 Modellierung von <i>Sulfolobus solfataricus</i>.....	103
3.3.1 Erweiterung und Validierung des Modells.....	103
3.3.2 Charakterisierung des Stoffwechsels für verschiedene Kohlenstoffquellen.....	108
3.3.2.1 Glucose, Lactose und Mannose.....	111
3.3.2.2 Acetoin.....	122
3.3.2.3 Phenol.....	128
3.3.2.4 L- und D-Arabinose.....	133
3.3.2.5 L-Fucose.....	141
3.3.2.6 Caseinhydrolysat.....	153

4 Zusammenfassung.....	164
Danksagung.....	167
Abkürzungen.....	168
Abbildungsverzeichnis.....	169
Tabellenverzeichnis.....	173
Anhang.....	176
Literaturverzeichnis.....	192

Zusammenfassung

In der Systembiologie werden durch die mathematische Modellierung unterschiedlichster molekularer Prozesse neue Erkenntnisse über biologische Netzwerke gewonnen. So kann durch die Rekonstruktion genomweiter metabolischer Modelle der Stoffwechsel von Organismen bioinformatisch analysiert werden. Metabolische Modelle werden heutzutage unter Anderem zur Identifizierung von Angriffspunkten für Pharmazeutika in pathogenen Zellen und zur Optimierung biotechnologischer Prozesse eingesetzt. Darüber hinaus können metabolische Modelle als Wissenssammlung über die biochemischen Prozesse innerhalb eines Organismus angesehen werden und die experimentelle Versuchsplanung gezielt unterstützen. Hochinteressant für biotechnologische Fragestellungen ist dabei besonders der Stoffwechsel thermophiler Prokaryoten, für die allerdings nur eine sehr geringe Anzahl genomweiter metabolischer Modelle existiert.

In dieser Arbeit wurden zwei Ziele verfolgt. Zum Einen sollten etablierte Softwarepakete für die metabolische Modellierung zu einer Modellierungsplattform zusammengefügt werden. Zum Anderen sollten verfügbare metabolische Modelle thermophiler Prokaryoten erweitert und der Kohlenhydratstoffwechsel dieser Organismen erstmals für viele verschiedene Kohlenstoffquellen detailliert charakterisiert werden.

Die in dieser Arbeit entwickelte Modellierungsplattform unterstützt die automatisierte Durchführung und Analyse einer großen Anzahl an Simulationen und ermöglicht erstmals die vollständig datenbankbasierte Verwaltung und Analyse metabolischer Modelle. Neben einer Anzahl etablierter mathematischer Methoden werden auch neue graphische Analysemethoden wie die elementzentrische Analyse von Modellflüssen zur Verfügung gestellt. Diese eignet sich insbesondere zur *in silico* Analyse vorhergesagter Kohlenstoffflüsse und der Charakterisierung des Zentralstoffwechsels metabolischer Netzwerke.

Die metabolischen Modelle der thermophilen Prokaryoten *T. thermophilus* HB27 und *S. solfataricus* P2 konnten in dieser Arbeit in Umfang und Qualität deutlich erweitert werden, sodass sie nun als die umfangreichsten genomweiten

metabolischen Modelle thermophiler Prokaryoten gelten. Am Beispiel des Modells von *T. thermophilus* wurde gezeigt, dass die elementzentrische Analyse von vorhergesagten Kohlenstoffflüssen sehr gut mit experimentellen ^{13}C -Analysen übereinstimmt. Die temperaturabhängigen Parameter in diesem Modell führen außerdem zu besseren Vorhersagen für unterschiedliche Wachstumstemperaturen. Das *in vivo* Wachstum des Organismus könnte für viele Kohlenstoffquellen noch optimiert werden, da ein hoher Sauerstoffbedarf vorhergesagt und der Verlust von Protonen in der Atmungskette durch Diffusion einen Großteil der nicht-wachstumsassoziierten Energiekosten ausmacht. Die Analyse des Modells von *S. solfataricus* zeigte, dass der Organismus einige alternative Stoffwechselwege zur Fixierung von CO_2 und der Regeneration von Reduktionsäquivalenten besitzt. Das Modell konnte zudem dazu beitragen, die Abbauwege von L-Fucose und verschiedenen Aminosäuren im Organismus aufzuklären. *S. solfataricus* nutzt dabei bemerkenswerterweise oft identische Enzyme für den Abbau mehrerer Substrate.

Abstract

In the field of systems biology new insights on biological networks are being acquired via mathematical modelling of various molecular processes. In this regard, the reconstruction of genome-wide metabolic models allows for the *in silico* analysis of an organism's metabolism. Nowadays, metabolic models are often used for the identification of drug-targets in pathogenic cells or the optimisation of biotechnological processes. Moreover, metabolic models are considered repositories of knowledge concerning the biochemical reactions that can occur in an organism and are used as guidance for the design of experiments. The metabolism of thermophile prokaryotes is of especially high biotechnological interest. However, only a small number of genome-wide metabolic models has yet been published for thermophile organisms.

In this work two major aims have been pursued. First, established software for metabolic modelling should be integrated into a modelling platform. Second, available metabolic models of thermophile prokaryotes should be expanded and the carbohydrate metabolism of these organisms should be characterised for the first time in detail for various carbon sources.

The modelling platform that was developed in this work features the automated execution and analysis of large numbers of simulations and allows for the completely database-based administration and analysis of metabolic models. Next to established mathematical methods for the analysis of metabolic models the platform features new graphical methods like the element-centric analysis of *in silico* fluxes. This method is especially suited for the analysis of *in silico* carbon fluxes and the characterisation of the central metabolism of metabolic networks.

The metabolic models of the thermophile organisms *T. thermophilus* HB27 and *S. solfataricus* P2 were successfully expanded in size and quality and can now be considered the largest genome-wide metabolic models of thermophile prokaryotes. Using the model of *T. thermophilus* it was demonstrated that the element-centric analysis of predicted carbon fluxes is in good agreement with experimental ¹³C-fluxes. Temperature-dependent parameters that have been added to this model yield better predictions for different growth temperatures. The *in vivo* growth

of the organism could probably be optimised for several carbon sources since a high oxygen demand is being predicted and the majority of the non-growth-associated maintenance energy is due to the loss of protons in the respiratory chain via diffusion. The analysis of the metabolic model of *S. solfataricus* shows that the organism possesses a number of alternative pathways for the fixation of CO₂ and the regeneration of reducing equivalents. The model also contributed to the elucidation of the degradation pathways of L-fucose and various amino acids. *S. solfataricus* remarkably uses same sets of enzymes for the degradation of multiple substrates.

1 Einleitung

1.1 Metabolische Modellierung

Die technologischen Fortschritte der letzten Jahrzehnte in den Lebenswissenschaften und den „Omics“-Methoden führen zu einem drastischen Anstieg biologischer Datenmengen. Auf dieser Grundlage entwickelte sich der Anspruch, biologische Systeme nicht mehr reduktionistisch im Detail, sondern stattdessen integrativ, also in ihrer Gesamtheit zu verstehen. Aus diesem Paradigmenwechsel entstand ein neuer Zweig der Lebenswissenschaften, die Systembiologie [1]. Diese beschäftigt sich damit, biomolekulare Netzwerke anhand von experimentellen und bioinformatischen Daten zu rekonstruieren und zu modellieren [2,3]. Die Metabolomik (engl.: *metabolomics*), ein Teilbereich der Systembiologie, konzentriert sich dabei auf die Gesamtheit der Stoffwechselprodukte (Metabolite) und biochemischen Prozesse, die innerhalb eines Organismus unter exakt definierten Bedingungen stattfinden können [4]. Bereits 1999 wurde das erste genomweite metabolische Modell eines mikrobiellen Organismus veröffentlicht [5]. Seitdem fassen solche Modelle den jeweils aktuellen Wissensstand über den Stoffwechsel eines Organismus zusammen und ermöglichen Wissenschaftlern zudem Vorhersagen von *in vivo* Flussverteilungen, welche nützlich für eine Vielzahl von Anwendungen sind. Genomweite metabolische Modelle wurden unter anderem genutzt, um neue Zielstrukturen für Pharmazeutika in pathogenen Mikroorganismen und Krebszellen zu identifizieren [6–9] oder mikrobielle Stämme für die biotechnologische Produktion einer Chemikalie oder eines Wirkstoffes zu optimieren [10–12]. Metabolische Modelle werden weiterhin oft für die vorbereitende Versuchsplanung verwendet [13]. Hierbei entsteht oft ein iterativer Kreislauf, in dem die Daten, die aus solchen Experimenten gewonnen, verwendet werden, um wiederum die Qualität der metabolischen Modelle zu verbessern (Abbildung 1).

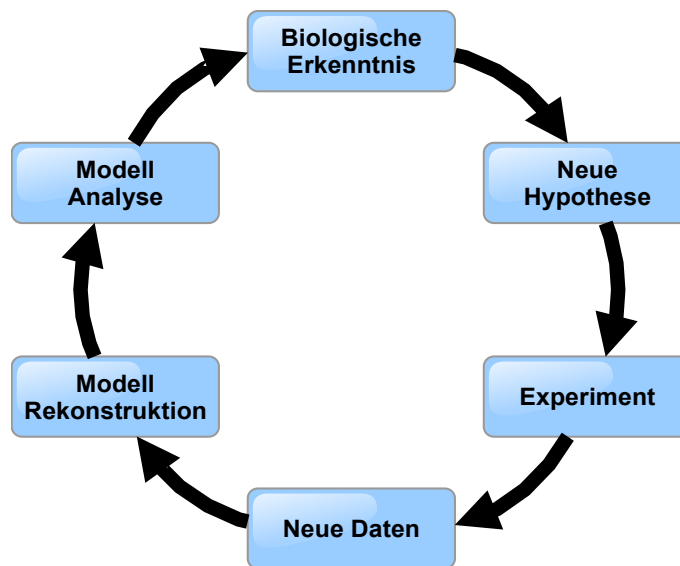


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ansatzes zur iterativen Verbesserung systembiologischer Modelle.

(Abbildung angefertigt nach [268])

Metabolische Netzwerke können entweder kinetisch oder stöchiometrisch modelliert werden [2,14]. Bei der in dieser Arbeit angewendeten stöchiometrischen Modellierung wird ein Modell aus biochemischen Reaktionen zusammengestellt, durch welche Metabolite in exakt definierten stöchiometrischen Verhältnissen ineinander umgewandelt werden können. Im Gegensatz zur kinetischen Modellierung werden dabei zeitabhängige Aspekte nicht beachtet. Dafür können stöchiometrische Modelle den gesamten bekannten Stoffwechsel eines Organismus umfassen und die Vorhersagen solcher Modelle können sehr schnell berechnet werden. Hierfür wird das metabolische Netzwerk in eine numerische Matrix umgewandelt, auf die mathematische Optimierungsmethoden angewandt werden können. Um Flüsse durch stöchiometrische Modelle zu berechnen, wird immer ein Fließgleichgewicht vorausgesetzt (engl.: *steady state*; *flux balance*), demzufolge sich die Metabolitkonzentrationen im Modell nicht ändern. Hierdurch vereinfacht sich das mathematische Problem der Optimierung. Nur wenige Reaktionen innerhalb eines stöchiometrischen Netzwerkes stimmen nicht mit dem Massenerhaltungssatz überein. Bei diesen handelt es sich um Biomassereaktionen, welche das Wachstum eines Organismus simulieren, sowie

Austauschreaktionen, welche gewissermaßen das modellierte Wachstumsmedium simulieren (Abbildung 2).

In stöchiometrischen Modellen wird die Energie, die ein natürlicher Organismus für sein Zellwachstum aufwendet, durch die Parameter GAM (wachstumsassoziierte Energiekosten) und NGAM (wachstumsunabhängige Energiekosten) repräsentiert [15]. Beides sind lediglich ATP-hydrolysierende Reaktionen, die entweder separat im Modell vorliegen oder im Falle der GAM auch in die Biomassereaktion integriert werden können. Der Großteil der GAM wird letztlich für die Synthese der Makromoleküle DNA, RNA und Proteine aufgewendet [16,17] und ist daher an die Wachstumsrate im Modell gekoppelt. Die NGAM wiederum fasst alle Prozesse zusammen, die nicht mit dem Wachstum des Organismus verknüpft sind, wie DNA-Reparaturprozesse oder Homöostase.

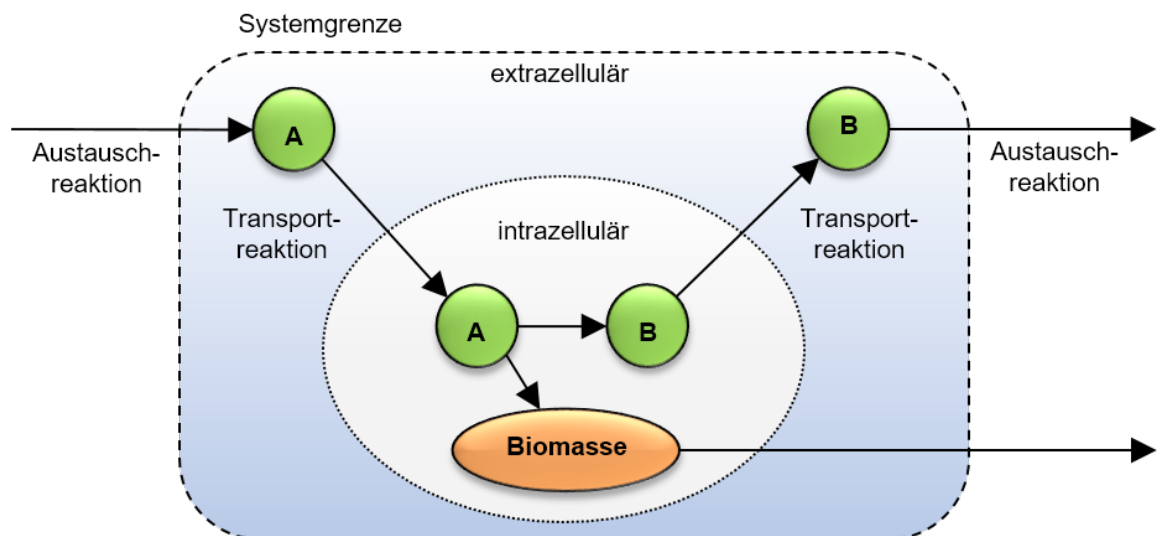


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Kompartimente eines stöchiometrischen Modells.

Das modellierte System besteht aus einer Zelle und ihrer direkten Umgebung. In dem gezeigten Beispiel existieren ein intrazelluläres und ein extrazelluläres Kompartiment. Der Metabolit A wird durch eine Austauschreaktion in das System eingebracht und durch eine Transportreaktion vom extrazellulären in das intrazelluläre Kompartiment transportiert. Anschließend wird er in andere Verbindungen (B) umgewandelt und in der Biomassereaktion verbraucht um virtuelle Biomasse zu bilden. Die Bildung des virtuellen Biomasse-Metaboliten repräsentiert das Wachstum der modellierten Population. (Abbildung und Text entnommen aus [73])

1.2 Genomannotationen

Die vollständige Sequenzierung des Genoms ist Voraussetzung für die metabolische Modellierung eines Organismus. Denn erst ausgehend von dieser können die in dem Organismus vorhandenen Enzyme annotiert werden, welche letztlich über die von ihnen katalysierten Reaktionen den Stoffwechsel des Organismus bestimmen. Die Qualität einer solchen Genomannotation ist daher entscheidend für den Modellierungsprozess. Die bekanntesten dabei verwendeten Klassifikationssysteme für Enzyme sind die *Enzyme-Commission*-Nummern (EC-Nummern) [18] und *Gene Ontology* (GO) [19]. Im Laufe der Zeit wurde eine Vielzahl an Programmen und Algorithmen entwickelt, um die automatische Annotation von Genomen zu verbessern. Darüber hinaus existieren Meta-Datenbanken, die versuchen, die Genomannotationen unterschiedlicher Annotationsquellen zu integrieren und so noch hochwertigere und transparentere Genomannotationen zu erzeugen. Ein Beispiel hierfür ist der in dieser Arbeit verwendete EnzymeDetector [20].

1.3 Anpassungsstrategien thermophiler Prokaryoten

Prokaryoten werden je nach ihrer optimalen Wachstumstemperatur als mesophil (20–44 °C), thermophil (45–80 °C) oder hyperthermophil (>80 °C) eingestuft [21,22]. Hyperthermophilie ist sowohl für Bakterien als auch Archaeen beschrieben, jedoch handelt es sich bei der Mehrheit der hyperthermophilen Organismen um Archaeen. Um Wachstum bei hohen Temperaturen zu ermöglichen, müssen die Makromoleküle (Proteine, Nukleinsäuren, Lipide) dieser Organismen stabil gegenüber thermischer Denaturierung sein [23–25]. Zu diesem Zweck haben thermophile Organismen im Laufe der Evolution Strategien entwickelt, die sowohl Veränderungen der oben genannten Makromoleküle als auch die Synthese schützender, löslicher Stoffwechselprodukte umfassen.

Die Stabilität der Zellhülle gegenüber hohen Temperaturen hängt wesentlich von der Zusammensetzung der Membranlipide ab. Archaeale Diether- und Tetraether-Lipide bestehen aus Isoprenoiden, die über Etherbindungen mit einem Glycerol-

Grundgerüst (Glycerol-1-phosphat) verknüpft werden. Bakterielle Lipide hingegen bestehen meist aus einem Glycerol-Grundgerüst (Glycerol-3-phosphat), welches über Esterbindungen mit Fettsäuren verbunden wird [26]. Die archaealen Lipide mit Ether-Bindung werden allgemein als hitzestabil beschrieben, da diese gegenüber bakteriellen Ester-Lipiden nur erschwert *in vitro* methanolysiert werden können [27] und bei allen thermophilen Archaeen sowie wenigen thermophilen Bakterien vorhanden sind [28,29]. Die Tetraether-Lipide der meisten thermophilen Archaeen enthalten Caldarchaeol. Die Isoprenoidketten dieser Lipide wurden kovalent verknüpft, sodass Sie eine rigidere Lipid-Monoschicht bilden [26]. In den Membranen thermophiler Bakterien konnten zudem verzweigt-kettige Fettsäuren, sehr langkettige Fettsäuren, Glycerolmonoester sowie Diol-Fettsäuren ohne Glycerol-Grundgerüst beobachtet werden [28,30–32]. Weiterhin wird vermutet, dass in die Zellmembran thermophiler Bakterien eingelagerte Carotinoide einen stabilisierenden Effekt besitzen [33–35].

Hitzeresistente Proteine aus thermophilen Organismen weisen häufiger sowohl geladene Aminosäuren auf, welche Ionenbindungen eingehen können, als auch kovalent verknüpfte Disulfid-Brücken zwischen Cystein-Resten [36–38]. Weiterhin wurden in einigen Archaeen auffällige Quartärstrukturen beobachtet, durch die Proteinuntereinheiten so angeordnet werden, dass der hydrophobe Proteinkern effizienter vor der hydrophilen Umgebung geschützt wird [39]. Unabhängig von der eigentlichen Proteinstruktur können Proteine auch durch die Anwesenheit kompatibler Solute wie Mannosylglycerat stabilisiert werden [40,41].

Um die DNA-Stabilität thermophiler Organismen zu gewährleisten, scheint interessanterweise nicht der GC-Gehalt des Genoms, sondern vielmehr die Genomgröße ein signifikanter Faktor zu sein, da die Genomgröße und Wachstumstemperatur in Bakterien negativ korreliert sind [42]. Spezialisierte Proteine, wie reverse Gyrasen oder Histon-ähnliche, DNA-bindende Proteine (wie Sac7d aus Archaeen), können die Konformation der DNA verändern und so ihren Schmelzpunkt weiter erhöhen [43–45]. Von K^+ - und Mg^{2+} -Ionen ist allgemein bekannt, dass sie stabilisierend auf DNA-Doppelstränge wirken. Dies trifft ebenso auf stickstoffreiche Polyamine zu, die wahrscheinlich aufgrund ihrer positiven

Ladungen einen äquivalenten Effekt erzielen. In dem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* konnten in diesem Zusammenhang viele neuartige, verzweigtkettige Polyamine entdeckt werden [46–49].

Thermophile Organismen sind aufgrund ihrer Lebensweise und ihrer hitzestabilen Enzyme interessant für biotechnologische Produktionsansätze [50,51]. Historisch relevant sind hier sicherlich die hitzestabilen Taq- und Pfu-DNA-Polymerasen [52,53], welche die effiziente Anwendung der PCR-Technik [54] erst ermöglichten. Darüber hinaus wurden thermophile Organismen bereits erfolgreich für den biologischen Abbau von Schwermetallen [55] und für die Verfügbarmachung erneuerbarer Energien aus Biomasse eingesetzt [56,57].

1.4 *Thermus thermophilus*

Bei *Thermus thermophilus* HB27 handelt es sich um ein thermophiles und bedingt halotolerantes Bakterium der phylogenetisch eher isolierten Abteilung Deinococcus-Thermus, welche evolutionsbiologisch zwischen den grampositiven Taxa Firmicutes-Chloroflexi-Actinobacteria und den gramnegativen Taxa Chlamydiae-Chlorobi-Bacteroidetes eingeordnet wird [58,59]. Der Organismus wurde ursprünglich 1974 aus heißen Quellen in Japan isoliert [60,61] und kommt natürlicherweise in einer großen Vielfalt von Süßwasser-Habitaten mit hohen Temperaturen vor, worunter auch heiße Komposte und aufgeheizte Kühlwasserkreisläufe fallen [62,63]. *T. thermophilus* wächst ausschließlich obligat aerob und heterotroph und es wurde bisher keine Motilität beobachtet [64,65]. Die Zellen sind stäbchenförmig, etwa 0,5 – 3,0 µm lang, gelblich-orange gefärbt und wachsen einzeln oder in Ketten [60]. Die Färbung der Zellen wird durch Carotinoide hervorgerufen [66,67]. Der natürliche Lebensraum des Organismus ist üblicherweise nährstoffarm, was ihn dazu zwingt Ressourcen zu nutzen sobald sie verfügbar werden. Im Gegensatz zu anderen Stämmen der Spezies *T. thermophilus* ist der Stamm HB27 nicht in der Lage, anaerob zu wachsen und Nitrat zu reduzieren [68]. Ebenso ist dieser Stamm nicht in der Lage, das kompatible Solut Trehalose zu synthetisieren, wodurch er nicht auf Medien wächst, die mehr als 2 % NaCl (w/v) enthalten. Das Genom von

T. thermophilus HB27 wurde 2004 vollständig sequenziert [68]. Die hohen Wachstumsraten und Zellausbeuten sowie etablierte Methoden zur genetischen Manipulation des Organismus machen *T. thermophilus* zu einem der wenigen thermophilen Modellorganismen [62,69–72]. In den Jahren 2013 und 2014 wurden in kurzer zeitlicher Folge zwei genomweite metabolische Modelle für den Organismus veröffentlicht [73,74]. Die hitzestabilen Enzyme aus *T. thermophilus* sind von hohem biotechnologischem Interesse [75] und der Organismus wird in der Strukturbioogie bevorzugt verwendet, da hitzestabile Proteine meist einfacher aufzureinigen und zu kristallisieren sind [62,68]. *T. thermophilus* ist zudem natürlicherweise in der Lage bestimmte Verbindungen von biologischem Interesse zu produzieren. Hierunter fallen zum Einen Rhamnolipide [76,77], welche als Tenside wirken und die Aufnahme hydrophober Substrate durch den Organismus verbessern [78,79]. Zum Anderen produziert *T. thermophilus* Mannosylglycerat als kompatibles Solut [80] wenn der Organismus osmotischem Stress ausgesetzt ist [81]. Da gezeigt wurde, dass Mannosylglycerat die Stabilität von Proteinen verbessern kann [40], wurden bereits Patente für die Nutzung der Verbindung als Stabilisator für biologische Materialien eingereicht [82].

1.5 *Sulfolobus solfataricus*

Das hyperthermophile Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* gilt als Modellorganismus für die archaeale Anpassung an extreme Lebensräume und sich ändernde Nährstoffbedingungen [83–85]. Es wurde erstmals 1980 in Italien aus heißen, sauren Quellen isoliert [83,86]. Der optimale Wachstumsbereich des Organismus liegt dementsprechend bei 80 °C (60 – 92 °C) und pH 2 – 4 [87]. *S. solfataricus* ist obligat aerob und in der Lage sowohl heterotroph auf organischen Kohlenstoffquellen als Energie- und Kohlenstoffquelle als auch chemolithoautotroph auf reduzierten Schwefelverbindungen als Energiequelle und Hydrogencarbonat als Kohlenstoffquelle zu wachsen [88]. Für einige Stämme des Organismus wurde allerdings auch berichtet, dass sie die Fähigkeit zum chemolithoautotrophen Wachstum wieder verloren haben [89]. *S. solfataricus* ist weiterhin dafür bekannt, eine große Anzahl unterschiedlichster Kohlenhydrate, wie

Pentosen, Hexosen, Oligo- und Polysaccharide, Alkohole, Ketone und Aromaten, abbauen zu können [24,85,90–92]. Das Genom von *S. solfataricus* P2 wurde 2001 vollständig sequenziert [93] und es existiert ein genetisches System zur Erzeugung von Knockout-Mutanten einzelner Gene [94,95]. Im Jahr 2012 wurde ein genomweites metabolisches Modell des Organismus veröffentlicht, welches damit auch das erste metabolische Modell für ein thermophiles Archaeum darstellt [92].

1.6 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wurden zwei aufeinander folgende Ziele verfolgt. Zum Ersten sollte ausgehend von existierender Modellierungssoftware eine Plattform geschaffen werden, die die Verwaltung und Analyse einer großen Anzahl von metabolischen Modellen und Simulationen ermöglicht und darüber hinaus neue graphische Analysemethoden zur effizienten Charakterisierung metabolischer Modelle zur Verfügung stellt. Diese Plattform sollte anschließend für die Rekonstruktion und detaillierte Analyse des Kohlenhydratstoffwechsels thermophiler Prokaryoten eingesetzt werden. Thermophile Prokaryoten sind durch ihre Lebensweise und der besonderen Eigenschaften ihrer Makromoleküle und Stoffwechselprodukte hochinteressant für biotechnologische Fragestellungen. Allerdings existiert bisher nur eine begrenzte Anzahl an genomweiten metabolischen Modellen für solche Organismen. Hierbei handelt es sich um die Modelle der Bakterien *Clostridium thermocellum* [96–98], *Moorella thermoacetica* [99], *Thermus thermophilus* [73,74] sowie des Archaeons *Sulfolobus solfataricus* [92]. Andere Modelle thermophiler Organismen sind ausschließlich auf den Zentralstoffwechsel beschränkt [100–102] und können daher nur die wesentlichsten Aspekte des Stoffwechsels repräsentieren. Da es sich bei *T. thermophilus* und *S. solfataricus* um prominente Modellorganismen handelt und die Modelle dieser Organismen bereits am umfangreichsten waren, wurden diese für die weitere metabolische Rekonstruktion und Analyse im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt.

2 Material und Methoden

2.1 Metabolische Modellierung

2.1.1 Repräsentation metabolischer Netzwerke

Ein metabolisches Netzwerk spiegelt wider, in welchen stöchiometrischen Verhältnissen Metabolite innerhalb eines Organismus ineinander umgewandelt werden können. Die Darstellung solcher Netzwerke kann als Liste chemischer Reaktionen, als stöchiometrische Matrix oder als Graph erfolgen (Abbildung 3) [103].

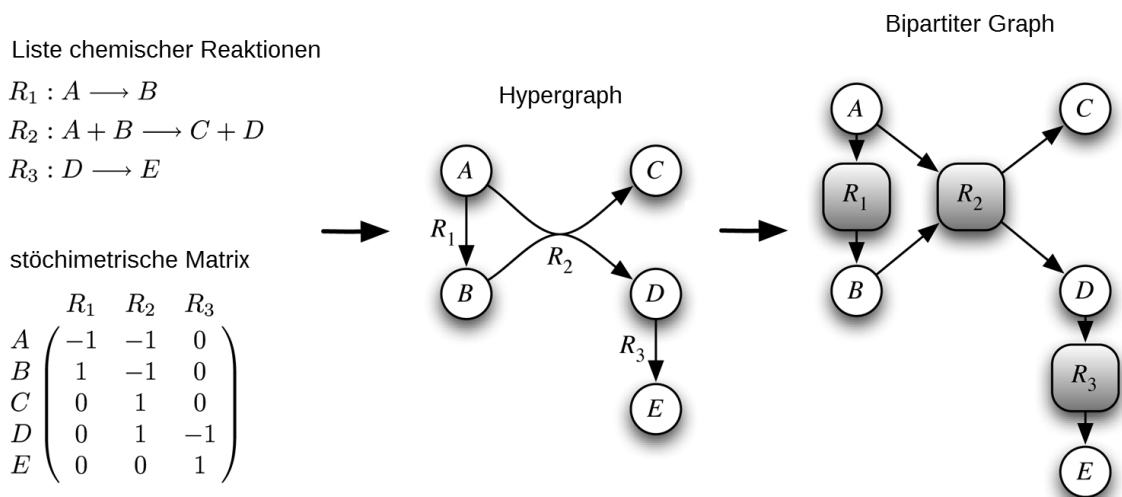


Abbildung 3: Darstellungsformen stöchiometrischer, metabolischer Modelle.

Die Repräsentationen metabolischer Modelle unterscheiden sich in ihrem Informationsgehalt, ihrer Lesbarkeit für den Menschen und ihrer mathematischen Zugänglichkeit. (Abbildung und Text übernommen von [73] und modifiziert nach [103])

Die Darstellung eines metabolischen Netzwerks als Liste oder Graph ist leicht von Menschen lesbar. Bei der Darstellung eines Netzwerks als Graph geht jedoch ein essentieller Aspekt, die Stöchiometrie, verloren, da nicht ersichtlich ist, in welchen Verhältnissen Metabolite ineinander umgewandelt werden. Daher werden metabolische Netzwerke meist in Form einer Liste manuell bearbeitet und

gespeichert. Mathematischen Optimierungsmethoden hingegen verwenden intern meist Matrizen, da diese für mathematische Operationen besser geeignet sind.

Die in dieser Arbeit verwendeten Modelle wurden im metano-Format (Kapitel 2.1.3) als Liste chemischer Reaktionen bearbeitet. Die Optimierungs- und Analysemethoden des metano-Softwarepakets wandeln die Netzwerke intern jeweils in eine stöchiometrische Matrix S um. Die Metabolite entsprechen den Zeilen und die Reaktionen den Spalten dieser Matrix. Bei einer Anzahl von m Metaboliten und n Reaktionen weist diese demnach die Dimensionen $m \times n$ auf. In der Matrix selbst werden die stöchiometrischen Koeffizienten aller Metabolite in allen Reaktionen festgehalten, wobei positive Vorzeichen für Reaktanden auf der rechten und negative Vorzeichen für Reaktanden auf der linken Reaktionsseite stehen [104,105].

Die zeitliche Änderung der Metabolitkonzentrationen x in einem metabolischen Netzwerk wird durch die Abbildung eines Flussvektors v auf die stöchiometrische Matrix S berechnet (1). Der Flussvektor v repräsentiert die Flüsse durch die Reaktionen des Netzwerks. Der Vektor x besitzt die Dimension m .

$$(1) \quad \frac{dx}{dt} = S \cdot v$$

2.1.2 Einschränkungsbasierte Modellierung

Alle mathematischen Optimierungs- und Analysemethoden dieser Arbeit setzen die Annahme des Fließgleichgewichts (engl.: *steady-state*; *flux balance*) voraus. Mathematisch wird das Fließgleichgewicht dadurch definiert, dass die zeitliche Änderung aller Metabolitkonzentrationen innerhalb eines metabolischen Modells null beträgt und damit alle Metabolitkonzentrationen konstant sind (2).

$$(2) \quad \frac{dx}{dt} = S \cdot v = 0$$

Die Annahme des Fließgleichgewichts ist durchaus zulässig, da sich dieses Phänomen bei konstanten äußeren Bedingungen für viele biologische Systeme einstellt. Für mikrobiologische Systeme finden sich solche Bedingungen vor allem

in Chemostat-Bioreaktoren, in denen zu- und abführende Flüsse zu annähernd konstanten Konzentrationen von Biomasse und Stoffwechselprodukten führen.

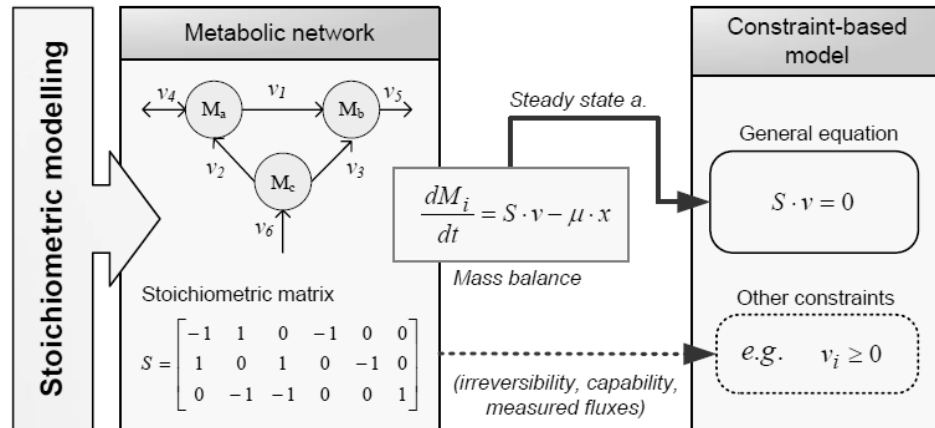


Abbildung 4: Schematische Darstellung der einschränkungsbasierten Modellierung.

Ausgehend von einem metabolischen Netzwerk wird durch die Annahme des Fließgleichgewichts, die Einhaltung des Massenerhaltungssatzes sowie das Vorhandensein linearer Ungleichungen (irreversible Reaktionen, manuell eingestellte Flüsse) ein Lösungsraum bzw. ein einschränkungs-basiertes Modell definiert. (Abbildung übernommen von [269].)

Bei der einschränkungs-basierten Modellierung (engl.: *constraint-based modelling*) wird durch das Fließgleichgewicht (2) und weitere lineare Ungleichungen (3) ein Lösungsraum aufgespannt (Abbildung 4), welcher durch lineare Optimierung auf die Maximierung (oder Minimierung) einer bestimmten Zielfunktion optimiert werden kann [104,105]. Die linearen Ungleichungen in metabolischen Modellen werden üblicherweise durch irreversible Reaktionen sowie Reaktionen mit bekannten Flüssen (wie Substrataufnahmeraten) festgelegt. Für jede Reaktion i existiert dabei eine untere Schranke $v_{i,min}$ und eine obere Schranke $v_{i,max}$. Allerdings können auch andere Einschränkungen, wie zum Beispiel Aufspaltungsverhältnisse der Flüsse zwischen verschiedenen Stoffwechselwegen eingestellt werden. Über die zusätzlichen linearen Ungleichungen können letztlich jegliche gewünschten Szenarien definiert werden (Knockout-Mutanten, Verfügbarkeit von Nährstoffen, Export von Stoffwechselprodukten).

$$(3) \quad v_{i,min} \leq v_i \leq v_{i,max}$$

2.1.3 Das metano-Softwarepaket

Die frei verfügbare Software metano¹ beinhaltet zahlreiche Methoden zur Analyse metabolischer Netzwerke. Für die in dieser Arbeit verwendeten Modelle wurden die in metano realisierten folgenden Methoden angewendet:

- FBA (engl.: *Flux Balance Analysis*, Kapitel 2.2.1)
- FVA (engl.: *Flux Variability Analysis*, Kapitel 2.2.2)
- MOMA (engl.: *Minimization Of Metabolic Adjustment*, Kapitel 2.2.3)
- „Dead-end“-Analyse (Kapitel 2.2.5)
- Metabolitzentrische Analyse (Kapitel 2.2.6)
- Metabolitfluss-Minimierung (Kapitel 2.2.7)

Modelle im metano-Format bestehen aus Listen chemischer Reaktionen, die in einfachen Text-Dateien gespeichert werden. Eine Reaktion im metano-Format ist wie folgt zusammengesetzt:

```
3.2.1.68_RXN-4301 : 1 glycogen <=> 1 maltodextrin
```

Der Reaktionsname (links) wird von der eigentlichen Reaktion (rechts) durch einen Doppelpunkt getrennt und kann frei gewählt werden. Metabolite werden über ihren ebenfalls frei wählbaren Namen identifiziert, daher ist die einheitliche Schreibweise aller identischen Metabolite essentiell für die korrekte Modellierung. Modelle im metano-Format können ebenfalls in das SBML-Format (engl.: *Systems Biology Markup Language*) [106] exportiert werden. Analog können Modelle im SBML-Format automatisch in das metano-Format umgeschrieben werden.

¹ TU Braunschweig, <http://metano.tu-bs.de/>

2.1.4 Informationsquellen und Datenbanken

Zu Zwecken der Literaturrecherche wurden das Literaturverzeichnis PubMed² und die Suchmaschine GoogleScholar³ verwendet.

Informationen über biochemische Reaktionen und Enzyme wurden aus den Datenbanken BKM-react [107], BRENDA [108], MetaCyc [109] und KEGG [110] abgerufen. Die Datenbank BKM-react ist für den Modellierungsprozess besonders vorteilhaft, da sie sämtliche Reaktionen der Datenbanken BRENDA, MetaCyc und KEGG in integrierter und nicht-redundanter Form zusammenfasst.

Informationen über annotierte (membranständige) Transporter wurden aus der TransportDB [111] abgerufen.

Die Identifizierung der für die Modellierung relevanten Genloci und Enzyme erfolgte zum Großteil anhand von Genomannotationen der integrierten Datenbank EnzymeDetector⁴ [20]. Der EnzymeDetector vereinigt die Genomannotationen der Datenbanken UniprotKB [112], KEGG [110], PATRIC [113], BRENDA [108], AMENDA [108] und NCBI RefSeq [114] und ergänzt sie um Annotationen bioinformatischer, sequenzbasierter Tools wie BLAST [115], BrEPS [116] und PFAM [117]. Durch die Gewichtung einzelner Annotationsquellen können diese schnell verglichen werden. Außerdem wird für jede Zuordnung einer EC-Nummer zu einem Genlokus (der EnzymeDetector ist momentan auf die Annotation von metabolisch relevanten Enzymen beschränkt) ein zusammenfassender Konfidenzwert berechnet. Die Höhe dieser Werte unterscheidet sich je nach Organismus und ermöglicht es einzuschätzen, wie zuverlässig eine bestimmte Annotation ist. Da der EnzymeDetector in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelt wurde, sind neben der öffentlich zugänglichen Weboberfläche auch interne Tabellen aus MySQL-Datenbanken verfügbar, welche letztlich in den Modellierungsprozess mit eingebunden wurden.

2 U.S. National Institutes of Health, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

3 Google Inc., <https://scholar.google.de/>

4 TU Braunschweig, <http://edbs.tu-bs.de/>

Die Suche nach Informationen über Metabolite und biochemische Reaktionen konnte durch die *Metabolic Modeller Tool Box*⁵ (MMTB) [118] stark vereinfacht werden. In der Weboberfläche der MMTB kann durch Eingabe unvollständiger Reaktionen nach passenden bekannten Reaktionen in der BKM-react Datenbank gesucht werden. Wenn vom Benutzer dabei ein spezifischer Organismus (nur Prokaryoten) vorgegeben wird, werden zu den entsprechenden Reaktionen zusätzlich die Konfidenzwerte des EnzymeDetectors für die entsprechenden Enzyme in diesem Organismus angegeben. Dies erleichtert das manuelle Schließen von Lücken in metabolischen Modellen enorm. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem weitere Funktionen zur MMTB hinzugefügt. So kann die Suche nach Metaboliten nun auch durch chemische Summenformeln oder unvollständige Synonyme erfolgen.

2.1.5 Erweiterung der Ausgangsmodelle

In dieser Arbeit wurden die metabolischen Modelle der thermophilen Prokaryoten *Thermus thermophilus* HB27 (2013) [73] und *Sulfolobus solfataricus* P2 (2012) [92,118] verwendet, um den Stoffwechsel der Organismen beim modellierten Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen zu charakterisieren. Beide Modelle wurden in der eigenen Arbeitsgruppe erstellt und basieren auf den veröffentlichten Genomsequenzen der Organismen [68,93] sowie den Genomannotationen des Tools EnzymeDetector [20]. Beide Modelle wurden ursprünglich im metano-Format erstellt und weiterhin in diesem Format bearbeitet.

Auf Grundlage aktueller EnzymeDetector-Genomannotationen konnten die in den Modellen vorhandenen Genloci aktualisiert und neue Reaktionen zu den Modellen hinzugefügt werden. Durch manuelle Literaturrecherche konnten die Modelle weiter im Umfang vergrößert werden, wobei insbesondere auf die Vollständigkeit von Stoffwechselwegen für den Abbau von Kohlenstoffquellen geachtet wurde. Die Modelle konnten darüber hinaus an experimenteller Daten angepasst werden, wie

5 TU Braunschweig, <http://mmtb.tu-bs.de/>

Substrataufnahmeraten, Wachstumsraten, Biomassezusammensetzungen und den Einbau von Kohlenstoff aus verschiedenen Substraten in die Biomasse.

Die Energieparameter GAM (wachstumsassoziierte Energiekosten) und NGAM (wachstumsunabhängige Energiekosten) wurden nach Möglichkeit für jedes Modell und jedes Substrat auf Grundlage experimenteller Daten berechnet. Die GAM wurde für *S. solfataricus* ausgehend von der Biomassezusammensetzung (für das jeweilige Substrat oder für Glucose falls keine Biomassezusammensetzung für das Substrat verfügbar war) über einen publizierten Algorithmus abgeschätzt [17]. Für *T. thermophilus* hingegen wurde der bisher verwendete Wert des Modells *iJO1366* von *Escherichia coli* [119] beibehalten. Die NGAM wurde in beiden Modellen stets an verfügbare experimentelle Wachstumsraten oder an den Einbau von Kohlenstoff in die Biomasse angepasst.

2.1.6 Modell-Nomenklatur

In beiden metabolischen Modellen, die in dieser Arbeit erweitert und analysiert wurden, wird eine einheitliche Nomenklatur für die Benennung von Reaktionen, Metaboliten und Stoffwechselwegen verwendet. Diese wurde für das Ausgangsmodell von *T. thermophilus* entworfen [73] und erleichtert die Analyse von Modellen. Das Modell von *S. solfataricus* wurde sukzessive ebenfalls in diese Form überführt. Reaktionsnamen sind in dieser Nomenklatur aus drei Teilen zusammengesetzt, die durch Unterstriche voneinander getrennt werden. Der erste Teil besteht aus Abkürzungen für Stoffwechselwege zu denen die Reaktion zugeordnet wird (Anhang 4). Diese werden ebenfalls durch Unterstriche voneinander getrennt. In den unten aufgeführten Beispielen wird Reaktion (1) dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel sowie dem Entner-Doudoroff-Weg und Reaktion (2) den Biosynthesewegen der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan zugeordnet:

- (1) carb_entner_4.1.2.55_KDPGALDOL-RXN
- (2) aa_phe_tyr_trp_shiki_2.2.1.10_RXN-10031

Der zweite Abschnitt der Reaktionsnamen besteht aus (durch Unterstriche getrennten) EC-Nummern. Diese zeigen an, durch welche Enzyme die Reaktion im jeweiligen Modell katalysiert wird. Der letzte Abschnitt (der Abschnitt der auf den letzten Unterstrich folgt) besteht aus einer Reaktions-ID für die jeweilige Reaktion in einer der Datenbanken MetaCyc, BRENDA oder KEGG (in exakt dieser Priorisierung). Ist die Reaktion in keiner der Datenbanken vorhanden, so wird stattdessen ein eigener Name vergeben. In den oben aufgeführten Beispielen können beide Reaktionen in MetaCyc über die IDs „KDPGALDOL-RXN“ und „RXN-10031“ nachgeschlagen werden.

2.1.7 Semi-automatische Genom-Annotation

Das in dieser Arbeit für die automatisierte Annotation von Genen verwendete Skript [73,120,121], im Folgenden „BRannotate“ genannt, basiert auf den integrierten Genomannotationen des Tools EnzymeDetector [20]. Im Anhang findet sich ein Fließschema der aktuellen BRannotate-Version (Anhang 1 – 3). Der Zweck dieses Programms ist es, EnzymeDetector-Annotationstabellen aufzuarbeiten, um dadurch für jeden Genlokus die zuverlässigste Annotation zu ermitteln. Als Resultat werden biologisch aussagekräftige Genomannotationen mit hohen Konfidenz-Werten generiert, die in eindeutigen Gen ↔ EC-Nummer Zuweisungen resultieren. Zusätzlich zu zwei bereits in dem Skript benötigten Schwellenwerten (im Folgenden niedriger und hoher Schwellenwert) wurde ein dritter Schwellenwert (mittlerer Schwellenwert) eingeführt. Annotationen mit geringeren Konfidenzwerten als der niedrige Schwellenwert werden immer verworfen, wohingegen Annotationen mit Konfidenzwerten unter dem hohen Schwellenwert einer weiteren Prüfung unterzogen werden. Annotationen mit Konfidenzwerten größer als der hohe Schwellenwert werden immer akzeptiert. Der neue mittlere Schwellenwert wird dazu verwendet, um Annotationen ohne dazugehörigen Genlokus (wie sie z. B. durch nachgewiesene Enzymaktivitäten aus Rohextrakten in der Datenbank BRENDA vorhanden sind) zu verwerfen, falls diese einen Konfidenzwert besitzen, der unter dem mittleren Schwellenwert liegt. Unter Verwendung der voreingestellten Konfidenzscores für einzelne

Annotationsquellen wurden für *T. thermophilus* HB27 die Schwellenwerte 12, 18 und 36 sowie für *S. solfataricus* P2 die Schwellenwerte 9, 16 und 32 benutzt. Diese Schwellenwerte resultieren in eindeutigen Annotationen für etwa ein Drittel aller Gene des jeweiligen Organismus.

Da Organismen, die weniger gut untersucht sind und dadurch insgesamt eher geringe Konfidenzwerte aufweisen, hauptsächlich durch bioinformatische Tools annotiert werden, wurde ein weiterer Schwellenwert für e-Values der BLAST-Homologiesuche eingeführt. Dieser erlaubt es, Annotationen durch BLAST-Ergebnisse zu verwerfen, wenn deren e-Values über dem Schwellenwert liegen. Für alle Organismen wurde zudem die manuelle Anpassung der vom EnzymeDetector vorgegeben Gewichtung einzelner Annotationsquellen ermöglicht.

Das Skript BRannotate berücksichtigt, dass viele prokaryotische Gene oft nur für ein einzelnes Gen-Produkt kodieren und es wird nach Möglichkeit nur eine Annotation pro Genlokus akzeptiert. Das Skript wurde derart erweitert, dass multifunktionale Enzyme nun besser identifiziert und die entsprechenden Annotationen akzeptiert werden. Hierfür werden Informationen über bekannte multifunktionale Enzyme aus den Datenbanken UniProt und NCBI mit den Annotationen und Charakteristika für einzelne Genloci (wie der Genlänge und der Position von Enzymdomänen) verglichen.

2.2 Analyse der metabolischen Modelle

2.2.1 Flux Balance Analysis

Die FBA (engl.: *Flux Balance Analysis*) [104,105] ist eine mathematische Optimierungsmethode, welche es durch lineare Programmierung ermöglicht, die Flussverteilung eines metabolischen Modells unter Berücksichtigung des definierten Lösungsraumes auf eine vorgegebene Zielfunktion Z hin zu optimieren (Abbildung 5). Die FBA ist eine extreme Methode in dem Sinne, dass sie stets nur eine einzige optimale Lösung ermittelt und keine Flüsse zwischen alternativen Stoffwechselwegen aufgespalten werden. Allerdings sind oft weitere

optimale Lösungen möglich, da in den meisten metabolischen Netzwerken mehr Reaktionen als Metabolite vorhanden sind ($n > m$). Das lineare Gleichungssystem $S \cdot v = 0$ ist damit unterbestimmt und es existiert ein mehrdimensionaler Lösungsraum. Dieser sollte stets durch Methoden wie die FVA (Kapitel 2.2.2) in seiner Gesamtheit betrachtet werden.

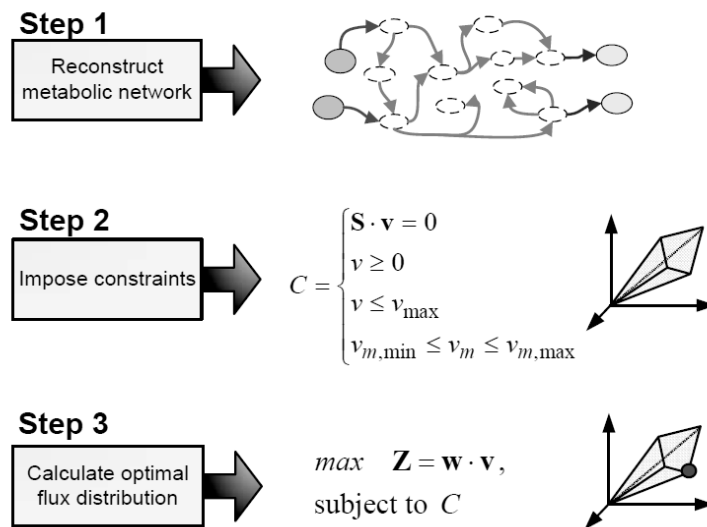


Abbildung 5: Notwendige Schritte zur Optimierung der Flüsse eines metabolischen Modells mittels *Flux Balance Analysis* (FBA).

Dargestellt ist die Erstellung des metabolischen Netzwerks (Schritt 1) und die Definition des Lösungsraumes (C) durch einschränkungs-basierte Modellierung (Schritt 2). Die Optimierung der Zielfunktion (Z) mittels FBA (Schritt 3) berechnet eine optimale Lösung innerhalb des definierten Lösungsraumes. (Abbildung übernommen von [269])

Als Zielfunktion der FBA wird üblicherweise der Fluss durch die Biomassereaktion gewählt, da diese das Wachstum des Organismus repräsentiert und angenommen wird, dass die meisten Organismen durch die Evolution auf maximale Wachstumsraten optimiert wurden. Denkbar sind jedoch auch andere Zielfunktionen, wie etwa die Maximierung der ATP-Produktion zur Erforschung der Effizienz eines biologischen Systems oder die Maximierung der *in silico* Produktion eines gewünschten Stoffwechselproduktes. Alle Simulationen in dieser Arbeit wurden mittels der in metano realisierten FBA durchgeführt.

2.2.2 Flux Variability Analysis

Aufgrund der Unterbestimmtheit metabolischer Modelle existieren meist mehrere Lösungen für die Optimierung einer Zielfunktion. Die FBA berechnet allerdings nur eine einzige dieser Lösungen. Um den Lösungsraum nach weiteren optimalen Lösungen zu durchsuchen, wurde die FVA (engl.: *Flux Variability Analysis*) entwickelt [122]. Diese Methode ist in der Lage, für jeden Reaktionsfluss v_i den minimal und maximal möglichen Wert zu ermitteln, wobei der Wert der Zielfunktion jedoch über einem festgelegten Schwellenwert (4) bleiben muss. Hierfür wird jeder Reaktionsfluss unter Berücksichtigung des bisher definierten Lösungsraumes über lineare Programmierung einzeln minimiert und maximiert.

$$(4) \quad |v_{\text{Zielfunktion}}| \geq \zeta \cdot |v_{\text{Zielfunktion, opt}}| \quad \text{wobei} \quad 0 < \zeta \leq 1$$

Wird der Schwellenwert für die Zielfunktion auf 100 % des über die FBA ermittelten Optimums festgelegt, spricht man von optimaler FVA, anderenfalls von suboptimaler FVA [123]. Die suboptimale FVA berücksichtigt, dass es sich bei dem modellierten Organismus um ein natürliches System handelt, welches nicht zwingend vollständig (wie von der FBA angenommen) auf die Zielfunktion optimiert ist [73]. Die suboptimale FVA räumt dem Modellierer zudem eine gewisse Fehlertoleranz ein, da Fehler in allen metabolischen Modellen aufgrund vieler unbekannter und nicht modellierter Variablen letztlich nicht vermieden werden können.

Aus der Differenz zwischen dem minimalen und maximalen Fluss einer Reaktion in allen optimalen Szenarien (kann mittels FVA bestimmt werden) lässt sich die Variabilität einer Reaktion berechnen (Abbildung 6). Diese stellt ein Maß für die Essentialität einer Reaktion hinsichtlich der Optimierung der Zielfunktion dar. Ist die Variabilität einer Reaktion groß, so kann sie im Modell durch andere Reaktionen ersetzt werden ohne dass der Wert der Zielfunktion (zu stark) abnimmt. Eine niedrigere oder gar keine Variabilität bedeutet, dass die Reaktion in allen optimalen Lösungen zwingend aktiv sein muss. Anhand der Variabilitätsbereiche von Reaktionen können zudem signifikante Unterschiede zwischen

Knockout-Mutanten zu berechnen. Im Gegensatz zur FBA geht die MOMA nicht von einer evolutionären Optimierung des (durch den Knockout veränderten) metabolischen Netzwerks auf die Zielfunktion aus. Stattdessen wird versucht, eine Flussverteilung zu ermitteln, die der Wildtyp-Flussverteilung so nahe wie möglich kommt (Abbildung 7). Hierfür wird nicht die Zielfunktion maximiert, sondern der euklidische Abstand (5) zur Flussverteilung des Wildtyps minimiert. Der durch das Fließgleichgewicht (2) und lineare Ungleichungen (3) definierte Lösungsraum wird dabei weiter beachtet.

$$(5) \quad D(v) = (v - v_{\text{wildtyp}})^T (v - v_{\text{wildtyp}})$$

Die MOMA wurde in dieser Arbeit nicht eingesetzt, sie wird aber von der in dieser Arbeit entwickelten Modellierungsplattform unterstützt.

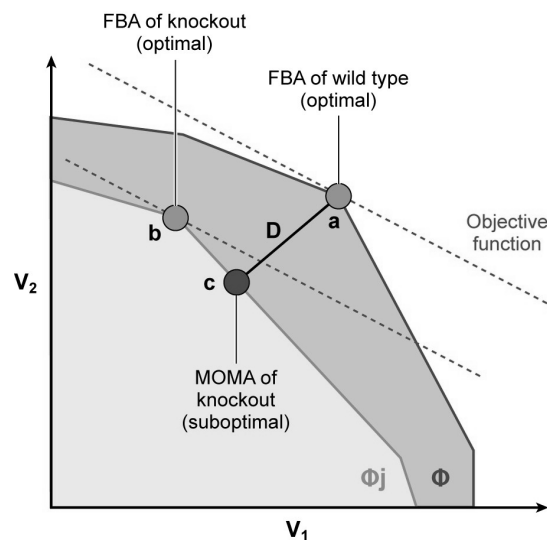


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Minimization Of Metabolic Adjustment (MOMA). Die mittels FBA vorhergesagte Wildtyp-Flussverteilung (a) dient als Referenz für die MOMA. Diese minimiert den euklidischen Abstand (D) zum Lösungsraum des Knockouts (gelb) um die Flussverteilung des Knockouts (c) zu berechnen. Diese Flussverteilung kann sich deutlich von einer mittels FBA berechneten Flussverteilung des Knockouts (b) unterscheiden. (Abbildung und Text übernommen von [73,271])

2.2.4 Thermodynamisch verbotene Zyklen

Als thermodynamisch verbotene Zyklen (engl.: *internal cycles*) werden Reaktionskreisläufe in metabolischen Modellen bezeichnet, durch die ein Ausgangsstoff ohne Energieverlust wieder in sich selbst umgewandelt werden kann (Abbildung 8). Dies ist jedoch nach dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik und dem Hess'schen Wärmesatz verboten, da Reaktionen immer nur in Richtung sinkender Enthalpie ablaufen dürfen [125]. Zur Vermeidung solcher Kreisläufe sollten Reaktionen in metabolischen Modellen nach Möglichkeit auf eine Reaktionsrichtung beschränkt werden.

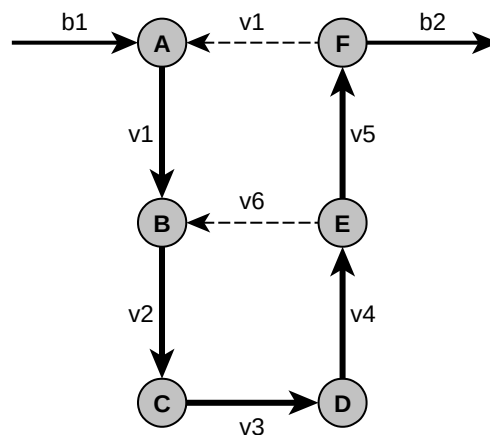


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines thermodynamisch verbotenen Kreislaufs.

Die Metaboliten B, C, D, E können in jeweils drei Schritten über die Reaktionen v2, v3, v4 und v6 wieder in sich selbst überführt werden, was nach thermodynamischen Grundsätzen nicht erlaubt ist. Die Reaktionen b1 und b2 stellen Austauschreaktionen dar. (Abbildung und Text übernommen von [73,272])

Die Identifizierung thermodynamisch verbotener Kreisläufe kann mittels optimaler FVA erfolgen, da die Reaktionen, die an den Kreisläufen beteiligt sind, zwangsläufig sehr hohe oder unendliche Variabilitäten aufweisen. Hohe Variabilitäten müssen im Umkehrschluss aber nicht zwingend auf verbotene Kreisläufe hinweisen. Die Anzahl thermodynamisch verbotener Kreisläufe wurde in den in dieser Arbeit verwendeten Modellen mittels optimaler FVA gezielt reduziert.

2.2.5 „Dead end“-Analyse

Im metano-Softwarepaket ist ein Tool zur Analyse isolierter Reaktionen und Metabolite (engl.: *dead end*) beigelegt. Isolierte Metabolite sind solche, die innerhalb des definierten Lösungsraums nicht in mindestens zwei unterschiedlichen Reaktionen produziert und verbraucht werden können. Dieses Tool hilft bei der Identifizierung von Lücken in metabolischen Modellen und kann bei auftretenden Fehlern, wie falsch eingestellten Reaktionsflüssen oder falsch geschriebenen Metabolitnamen, die entsprechenden Reaktionen und Metabolite im Modell anzeigen. Dieses Tool wurde vornehmlich aus Gründen der Fehler-Analyse verwendet.

2.2.6 Metabolitzentrische Flussanalyse

Zusammen mit der Veröffentlichung des metano-Softwarepakets wurde erstmals die Anwendung der metabolitzentrischen Analyse auf genomweite metabolische Modelle vorgestellt [126]. Im Gegensatz zur reaktionszentrischen Analyse werden dabei nicht Reaktionsflüsse betrachtet, sondern Metabolite sowie die sie produzierenden und verbrauchenden Reaktionen. Für die metabolitzentrische Aufschlüsselung dieser Reaktionen wird in metano die „*Split-ratio*“-Analyse verwendet. Die Ergebnisse dieser Analyse können durch die Virtualisierungssoftware AMEBA⁶ [126] (engl.: *Advanced MEtabolic Branchpoint Analysis*) in Form eines bipartiten Graphen dargestellt und metabolische Modelle auf diese Weise interaktiv erforscht werden. Bei der metabolitzentrischen Analyse sind insbesondere Metabolite interessant, an denen sich Reaktionsflüsse aufteilen bzw. verzweigen. Diese Metabolite stellen sogenannte metabolische Knotenpunkte dar, durch deren Betrachtung sich der modellierte Stoffwechsel äußerst gut charakterisieren lässt. Dargestellt werden dabei immer Metabolitknoten mit dem Gesamt-Metabolitfluss (Summe aller produzierenden oder verbrauchenden Reaktionsflüsse) für diesen Metaboliten, welche über Kanten mit Reaktionsknoten verbunden werden. Die Kanten sind mit den relativen

6 TU Braunschweig, <http://metano.tu-bs.de/?page=ameba>

Anteilen beschriftet, mit denen benachbarten Reaktionen zur Produktion bzw. dem Verbrauch eines Metaboliten beitragen.

2.2.7 Metabolitfluss-Minimierung

Die MFM (Metabolitfluss-Minimierung) ist eine im metano-Softwarepaket erstmals vorgestellte Methode zur Ermittlung der minimalen Flüsse durch Metabolite in metabolischen Modellen [126]. Analog zu dem Algorithmus der FVA, über welche minimale und maximale Reaktionsflüsse ermittelt werden, können durch die MFM die Beträge aller Reaktionsflüsse durch einen Metaboliten minimiert werden. Der definierte Lösungsraum wird ebenfalls weiter beachtet und es wird auch die zusätzliche Bedingung der (sub)optimalen Zielfunktion festgelegt.

Anhand der MFM können Metabolite identifiziert werden, die essentiell für die Optimierung der Zielfunktion sind, da diese stets einen minimalen Fluss von größer null aufweisen. Die MFM kann in diesem Zusammenhang auch zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Simulationen verwendet werden. Ein signifikanter Unterschied liegt vor, wenn sich die minimalen Flüsse eines Metaboliten in zwei Szenarien stark unterscheidet.

Wie auch die FVA wurde die (sub)optimale MFM zur Identifizierung signifikanter Unterschiede zwischen verschiedenen Szenarien eingesetzt. Auch für die suboptimale MFM wird in dieser Arbeit immer ein Schwellenwert von 95 % des Optimums der Zielfunktion vorausgesetzt.

2.3 Programmierung

Für jegliche in dieser Arbeit vorgestellte Software wurde Python⁷ 2.7 als objektbasierte Programmiersprache und MariaDB⁸ 10.1.21 (entspricht MySQL 5.6 – 5.7) als relationales Datenbanksystem verwendet. Außer der veröffentlichten Software metano und AMEBA [126] wird außerdem das Python-Modul Matplotlib⁹ zur Erzeugung und den Export von Graphen benötigt. Durch die interne

⁷ Python Software Foundation, <https://www.python.org/about/>

⁸ MariaDB Corporation, <https://mariadb.com/kb/en/mariadb/what-is-mariadb-101/>

⁹ The Matplotlib development team, <http://matplotlib.org/>

Verwendung von metano ist für die Ausführung der Skripte zudem eine Linux-Umgebung erforderlich.

2.3.1 Bestehende Software

Zu Beginn dieser Arbeit existierte in der Arbeitsgruppe bereits ein etablierter Arbeitsablauf zur Erstellung, Kuration und Analyse metabolischer Modelle. Die Grundlage für die Rekonstruktion metabolischer Modelle bilden die Python-Skripte BRannoate (Kapitel 2.1.7) und simia, welche bereits zur semi-automatischen Erstellung genomweiter metabolischer Modelle verwendet wurden [73,120,121]. Das Skript BRannotate bereitet die integrierten Genomannotationen der Datenbank EnzymeDetector [20] zu biologisch sinnvollen Gen ↔ EC-Nummer Verknüpfungen auf. Basierend auf diesen semi-automatisch annotierten EC-Nummern werden die über diese Enzyme katalysierten Reaktionen aus der integrierten Reaktions-Datenbank BKM-react [107] abgerufen und im metano-Format ausgegeben. Diese können anschließend direkt in metabolische Modelle im metano-Format eingefügt werden. Die Softwarepakete metano (Kapitel 2.1.3) und AMEBA (Kapitel 2.2.6) [126] wiederum gestatten die Durchführung von Simulationen und die Analyse der metabolischen Modelle durch zahlreiche mathematische Methoden und Visualisierungen von Modellflüssen.

2.3.2 Standardisierte Speicherung von Modellparametern

Die Speicherung von Modellparametern erfolgt entweder datei- oder datenbankbasiert. Bei der dateibasierten Vorgehensweise wird die entsprechende Konfigurationsdatei bei jeder Ausführung eines Skriptes neu eingelesen und automatisch in den Datenbanktabellen für die aktuell verwendete Modellversion abgespeichert. Wenn die Parameter in Datenbanken gespeichert werden, geschieht dies in serialisierter Form über das Python-Modul cPickle¹⁰. Dies hat den Vorteil, dass die Parameter beim Einlesen direkt als einsetzbare Python-Objekte vorliegen, allerdings sind diese in den Datenbanken nicht von Menschen lesbar.

¹⁰ Python Software Foundation, <https://docs.python.org/2/library/pickle.html>

Bei der datenbankbasierten Vorgehensweise werden die Parameter dagegen direkt aus der Datenbank eingelesen. Ohne Änderungen der Modellparameter erfolgt dabei keine neue Abspeicherung. Konfigurationsdateien sind in Sektionen (wie zum Beispiel „Energieparameter“) mit unterschiedlichen Optionen (zum Beispiel „GAM“ und „NGAM“) und den dazugehörigen Werten unterteilt.

2.3.3 Erstellung einer Metabolitdatenbank

Zur Beschleunigung von Datenbank-Abfragen nach Metabolitinformationen und zur Verbesserung der Integration von Metabolitsynonymen wurde in dieser Arbeit eine Datenbank auf Grundlage der Metabolite in integrierten Reaktionsdatenbank BKM-react [107] erstellt. Da die Datenbank BKM-react in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelt wurde, konnten die verfügbaren MySQL-Tabellen der BKM-react verwendet werden. Als Speichersubsystem wurde für die Metabolitdatenbank InnoDB ausgewählt. In der Metabolitdatenbank werden mehrere Synonyme mit einem eindeutigen Metabolitnamen verknüpft, welcher wiederum mit einer chemischen Struktur in Form einer InChI¹¹-Zeichenkette (aus der BKM-react Datenbank) verbunden ist. Die Vergabe eindeutiger Metabolitnamen erfolgt dabei über die empfohlenen Metabolitnamen der Ursprungsdatenbanken MetaCyc [109], BRENDA [108] und KEGG [110] in exakt dieser Priorisierung (im Folgenden: „priorisiert“). Durch die Struktur der Metabolitdatenbank wird die Abfrage nach Informationen erheblich beschleunigt.

Zur Verknüpfung mehrerer Synonyme der Datenbank BKM-react mit einem eindeutigen Metabolitnamen und InChI wird der folgende Algorithmus durchlaufen:

1. Synonyme aus BRENDA mit mehr als 200 Zeichen werden verworfen.
2. InChI-Zeichenketten, die ein „R“ für generische Reste enthalten werden entfernt.
3. Die auf der BKM-react basierende Liste an Synonymen wird mit Synonymen aus BRENDA erweitert, wenn diese wiederum in BRENDA mit einem Synonym aus der bestehenden Liste verknüpft sind.

11 International Chemical Identifier, <https://iupac.org/who-we-are/divisions/division-details/inchi/>

4. Für jedes Synonym wird Folgendes durchgeführt:

- Schlage bekannte Schreibweisen des Synonyms in der BKM-react über die BKM-Metabolit-ID des Synonyms nach.
- Erweitere die Liste um weitere Schreibweisen von Metaboliten für Ketosäuren und CoA-Verbindungen sowie unterschiedliche Formatierungen (zum Beispiel Groß- und Kleinschreibung).
- Füge die Liste an Schreibweisen der Liste von Synonymen zu, sodass diese im Anschluss ebenfalls in der Metabolit-Datenbank abgespeichert werden.
- Versuche über das aktuelle Synonym oder die BKM-Metabolit-ID priorisiert eine Metabolit-ID aus den drei Ursprungsdatenbanken zu ermitteln.
- Ermittle anhand der Metabolit-ID aus einer der Ursprungsdatenbanken den empfohlenen Metabolitnamen und InChI.

Diese Vorgehensweise führt zu einer umfangreicheren Synonymliste (da für die BKM-react nicht alle Synonyme der BRENDA relevant sind) und zu einer besseren Trennung von Metaboliten, die in der BKM-react zusammengefasst werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in der BKM-react für den Abgleich von Metaboliten nur die ersten beiden Ebenen der InChI-Zeichenketten verwendet werden.

2.3.4 Automatisierte Erstellung von Szenarien

Die automatisierte Generierung einer definierten Anzahl von Szenario-Kombinationen auf Grundlage der verwendeten Modellparameter erfolgt innerhalb der Modellierungsplattform durch die Verwendung von Tupeln, welche indiziert und auf Duplikate überprüft werden können. Szenarien werden dabei auf Grundlage eines Modells und eines dafür definierten „Standardszenarios“ generiert. Dabei werden für jedes Szenario die folgenden Parameter festgelegt:

- Kohlenstoffquellen
- Stickstoffquellen
- Phosphorquellen

- Schwefelquellen
- Kohlenstoffaufnahme-Multiplikator
- Erzwungene, maximale Kohlenstoffaufnahme
- Zielfunktion
- Minimierung / Maximierung der Zielfunktion
- Knockouts
- Benutzerdefinierte Einschränkungen
- GAM
- NGAM.

Nach der Entfernung nicht vermeidbarer, redundanter Szenarien anhand dieser Parameter werden bereits vorhandene Simulationen auf diese Parameter überprüft, um Szenarien von bereits durchgeführten Simulationen überspringen zu können. Dies spart letztlich Ressourcen und macht die Software robuster gegenüber Ausfällen. Bei einer Unterbrechung der Durchführung von Simulationen kann daher (nach der erneuten Generierung aller gewünschten Szenarien) der Programmlauf an derselben Stelle fortgeführt werden. Szenarien können weiterhin betitelt und kommentiert werden, um wichtige Simulationen hervorzuheben.

2.3.5 Automatisierte Graphenerstellung

Die automatische Graphenerstellung zur Visualisierung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Szenarien erfolgt mit Hilfe des Python-Moduls Matplotlib. Die Auftragung der Werte erfolgt stets doppelt-logarithmisch als Scatterplot mit einer eingetragenen Winkelhalbierenden. Die Skalierung wird anhand der maximalen Werte aus beiden Szenarien automatisch optimiert. Für die Legenden- und Achsenbeschriftung werden Deutsch und Englisch als Sprache unterstützt. Es werden jeweils die Titel der Szenarien oder aber deren IDs in den Achsenbeschriftungen mit angegeben. Als Werte können Reaktionsflüsse, Metabolitflüsse oder minimale Metabolitflüsse aufgetragen werden. Die Unterscheidung nicht-signifikanter und signifikanter Reaktionen erfolgt auf Grundlage der relativen Verhältnisse eines Flusses zwischen zwei Szenarien oder aufgrund (sub)optimaler FVA (Kapitel 3.1.7).

2.3.6 Elementzentrische Flussanalyse

Für die Erweiterung der metabolitzentrischen Analyse (Kapitel 2.2.6) der Visualisierungssoftware AMEBA zu einer elementzentrischen Analyse werden die chemischen Summenformeln von Metaboliten benötigt. Diese werden aus der integrierten Metabolitdatenbank, welche in dieser Arbeit entwickelt wurde, abgerufen (Kapitel 2.3.3). Ausgehend von der chemischen Summenformel eines Metaboliten werden dann alle Flüsse, an denen der Metabolit beteiligt ist, auf die Flüsse des jeweils gewünschten chemischen Elements (z. B. Kohlenstoff) umgerechnet. So entspricht ein Fluss von 1 mmol Glucose $\cdot g_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) exakt 6 mmol Kohlenstoff $\cdot g_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Die relativen Flüsse, mit denen die Kanten in den generierten Graphen beschriftet werden, beziehen sich dann nicht mehr auf die Anteile der benachbarten Reaktionen am Elementfluss, sondern stattdessen auf das relative Verhältnis zwischen dem Elementfluss gegenüber der Gesamtaufnahme des Elements aus dem virtuellen Medium. Hierfür werden alle Elementflüsse von Austauschreaktionen, über die das jeweilige Element aufgenommen wird, summiert. Dadurch ist stets ersichtlich, wie groß der Fluss eines Elements in einer Reaktion gegenüber der Aufnahme des Elements ist.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Entwicklung einer Modellierungsplattform

Für die Rekonstruktion und Analyse metabolischer Modelle existiert bereits eine große Auswahl an Softwarepaketen [127–129], von denen die COBRA Toolbox am verbreitetsten ist [130,131]. Bisher wurde jedoch keine effiziente Möglichkeit vorgestellt, um eine beliebig große Anzahl an Modellen oder Simulationen zu verwalten und zu analysieren, da alle bisher veröffentlichten Modellierungsplattformen dateibasiert sind (die Interaktion mit dem Nutzer erfolgt letztlich immer durch Angabe einzelner Modelle und Simulationen in Form von Dateien). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine datenbankbasierte Modellierungsplattform entwickelt, in der großangelegte Batch-Simulationen ohne weitere Verwaltung von Dateien gespeichert und analysiert werden können. Ausgangspunkt der Modellierungsplattform waren mehrere Software-Pakete, welche innerhalb der Arbeitsgruppe zu Modellierungszwecken entwickelt wurden (Kapitel 2.3.1). Mit dem Ziel, eine umfassendere und leichter zu verwendende Software zu entwickeln, konnten diese zu einem gemeinsamen Softwarepaket zusammengeführt und die Modellverwaltung und -analyse auf das relationale Datenbanksystem MySQL umgestellt werden. Zusätzlich zur Integration dieser Softwarepakete wurden gleichzeitig Konfigurationsmöglichkeiten und Methoden entwickelt, die die Erstellung und graphische Analyse metabolischer Modelle weiter beschleunigen. Die Modellierungsplattform basiert auf der metano Toolbox und der Visualisierungssoftware AMEBA [126], welche grundlegende Methoden für die Erstellung und Analyse von metabolischen Modellen, wie FBA, FVA und MOMA (Kapitel 2.2) zur Verfügung stellen.

Zusätzlich zu grundlegenden Modellierungsmethoden werden durch die Modellierungsplattform die folgenden Funktionen bereitgestellt:

- (1) Die Verwaltung von Nutzern, Modellierungsprojekten, metabolischen Modellen und Simulationen in relationalen Datenbanken (Kapitel 3.1.1 und 3.1.2).
- (2) Die Verwaltung modellspezifischer Informationen zur automatisierten Erstellung von Reaktionen und Szenarien (Kapitel 3.1.5).
- (3) Die Planung und Durchführung von Batch-Simulationen auf Grundlage kombinierbarer, variabler Szenario-Parameter (Kapitel 3.1.6).
- (4) Die Nutzung erweiterter, graphischer Analysemethoden (Kapitel 3.1.7).

Die Software wurde mit Hilfe der objektorientierten Programmiersprache Python¹² und dem relationalen Datenbanksystem MySQL¹³ realisiert. Quellcode und Dokumentation sind dieser Arbeit beigelegt, und die Software kann für die in dieser Arbeit verwendeten Modelle getestet werden (Anhang 8). Zusätzlich ist die Software auf zwei weitere Arten verwendbar, als ausführbare Python-Skripte oder in Form von Python-Klassen. Analog zu dem zentral integrierten metano¹⁴ Softwarepaket [126] sind a) die ausführbaren Skripte kommandozeilenbasiert und auf jedem Linux-Betriebssystem ausführbar und b) die entwickelten Python-Klassen so strukturiert, dass sie in weiteren Software-Projekten leicht implementiert werden können. Die ausführbaren Skripte werden über Konfigurationsdateien konfiguriert und verwenden sowohl simple ASCII-Dateien als auch MySQL-Datenbanken als Eingangs- und Ausgabeformat.

Bei den in die Modellierungsplattform integrierten Software-Paketen handelte es sich ursprünglich um kommandozeilenbasierte Python-Skripte, die auf Grundlage von Eingangsdateien (wie metabolische Modellen und Szenariodefinitionen) Ergebnisse in Form von Kommandozeilen-Ausgaben und Ausgangsdateien erzeugten. Viele dieser Skripte können immer noch auf die gleiche Art und Weise

¹² Python Software Foundation, <https://www.python.org/>

¹³ Oracle Corporation, <https://www.mysql.de/>

¹⁴ Python Software Foundation, <https://www.python.org/>

genutzt werden, was allerdings bei der Verwendung der in dieser Arbeit vorgestellten neuen Skripte und Datenbanken oft nicht mehr notwendig ist. Gerade die neuen Module zur Verwaltung von Modellierungsprojekten sowie zur Durchführung und Analyse von Simulationen (`modeling.py`, `simulations.py`, `analysis_database.py`) sind stark mit allen anderen Skripten verknüpft und decken dadurch viele Funktionen ab (Abbildung 9). Für die automatisierte Annotation von Genen in metabolischen Modellen wird ein Skript verwendet, welches auf Grundlage konfigurierter Schwellenwerte und Präferenzen die integrierten Genomannotationen der Datenbank EnzymeDetector [20] aufbereitet und dabei für jeden Genlokus den oder die optimale Annotationen sucht (beschränkt auf metabolisch relevante Enzyme). In der aktuellen Version von BRannotate wurden Entscheidungsprozess, insbesondere für multifunktionale Enzyme, verbessert (Kapitel 3.1.3). Als Grundlage für die Erstellung und Analyse von metabolischen Modellen dient das *metano* Softwarepaket [126]. Über dieses Softwarepaket werden die reaktionszentrischen Methoden FBA, MOMA und FVA sowie die metabolizentrischen Methoden MFM und Split-ratio Analyse zur Verfügung gestellt. Ebenfalls Teil dieses Softwarepakets ist die „*Dead-end*“-Analyse zur Identifizierung blockierter Reaktionen. Für die automatisierte Erstellung von Reaktionen im metano-Format wird eine aktuelle Version der Software *simia* verwendet, welche ebenfalls bereits Anwendung bei der Erstellung metabolischer Modelle fand [73,121]. Die Visualisierung von Reaktionsflüssen und der metabolizentrischen Split-ratio Analyse findet über die Software AMEBA [126], welche im Rahmen dieser Arbeit erweitert wurde und dadurch nun in der Lage ist Metabolitflüsse in Flüsse eines chemischen Elements umzurechnen, um so zum Beispiel Kohlenstoffflüsse innerhalb eines Modells darzustellen (Kapitel 3.1.7).

3.1.1 Klassenstruktur

Die Klassen der vorgestellte Modellierungsplattform lassen sich in zwei Kategorien einteilen, erstens Klassen zum Austausch und zur Speicherung von Informationen und zweitens Klassen zur Generierung und Analyse von Daten (Abbildung 9). Zentral für die Integration nahezu aller Softwarepakete der Modellierungsplattform sind die Klassen `ConnectionManager` und `ModellingConfig`. Der `ConnectionManager` wird für das Einlesen von Konfigurationsdateien benötigt und speichert diese als ein Objekt der Klasse `ModellingConfig` ab. Letzteres kann von anderen Skripten verwendet werden, vornehmlich zum Herstellen von Verbindungen zu MySQL-Datenbanken. Die zentrale Klasse für die Verwaltung eines metabolischen Modells heißt `ModellingProject`. Einem `ModellingProject` wird zu jedem Zeitpunkt ein bestimmtes Modell zugewiesen und es speichert die für dieses Modell gültigen Modellierungsparameter (Kapitel 3.1.5) sowie übergeordnete Projekt-Informationen, wie die Beschreibung des Projektes und ein Konfigurationsobjekt (`ModellingConfig`). Aufbauend auf der Klasse `ModellingProject` kann die Klasse `ModellingSimulator` Modelle und Parameter in Datenbanken hinterlegen sowie diese Modellparameter verwenden, um Simulationen durchzuführen und diese ebenfalls in Datenbanken zu speichern. Wichtig für die Klassen `ModellingProject` und `ModellingSimulator`, aber auch für andere Klassen, die auf Informationen über Metabolite angewiesen sind, ist die Klasse `Translator`. Diese ermöglicht den Abruf von Metabolit-Informationen wie chemischen Summenformeln und vergibt standardisierte Synonyme für Metabolite (Kapitel 3.1.4). Die Klasse `Translator` ist immer eingebettet in ein Objekt der Klasse `Simia`, welches für den Abruf und gegebenenfalls den stöchiometrischen Ausgleich von Reaktionen aus der Datenbank BKM-react [107] verwendet werden kann. Nach der Erweiterung der Analyse der Software AMEBA ist diese gegebenenfalls auch abhängig von einem `ModellingProject`, um so Zugriff auf Metabolit-Informationen zu erhalten.

Das Annotations-Skript `BRannotate.py` sowie die Analyse-Skripte `analysis.py` und `analysis_database.py` beinhalten keine eigenen Klassen, sind jedoch abhängig von den Klassen anderer Skripte. Während `BRannotate.py` lediglich Zugriff auf

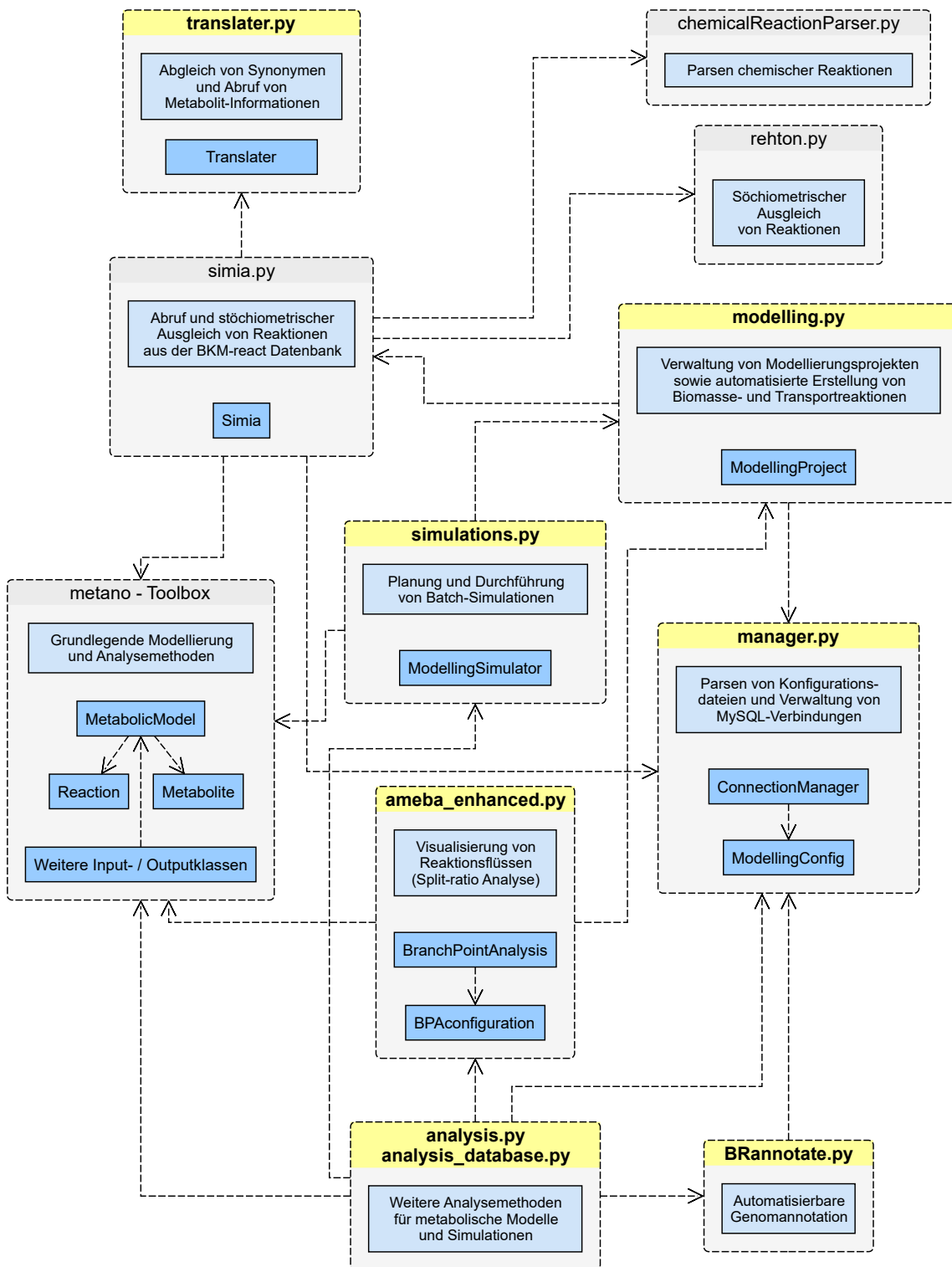


Abbildung 9: Übersicht der wichtigsten Skripte und Klassen sowie deren Abhängigkeiten innerhalb der Modellierungsplattform.

Kanten stellen Abhängigkeiten der Skripte untereinander dar. Gelb unterlegt und fett geschriebene Skripte wurden neu entwickelt oder in größerem Umfang erweitert.

MySQL-Tabellen des EnzymeDetectors benötigt, sind die Analyse-Skripte stärker mit den Klassen ModellingSimulator und ModellingProject verknüpft. Diese Skripte beinhalten Methoden für die Analyse von in Datenbanken abgelegten Modellen und Simulationen (Kapitel 3.1.7).

3.1.2 Datenbankstruktur

Um die verschiedenen Funktionen der Modellierungsplattform zu integrieren und um zukünftige Entwicklungen der Software zu erleichtern, wurden so viele Skripte wie möglich auf die Verwendung von MySQL-Datenbanken angepasst. Hierdurch wird zudem die zentrale Verwaltung von Benutzern, Modellierungsprojekten, Modellen und Simulationen erst ermöglicht. Die MySQL-Tabellen der Modellierungsplattform werden mit dem InnoDB Speichersubsystem angelegt, da dieses im Gegensatz zum MyISAM Speichersubsystemen Fremdschlüssel und Transaktionen unterstützt. Fremdschlüssel werden für die konsistente Verknüpfung der Tabellen untereinander benötigt (Abbildung 10) und Transaktionen stellen die Integrität der Daten bei Schreibaktionen sicher.

Die Verwaltung der Benutzer basiert auf dem WordPress¹⁵-Plugin „WP User“¹⁶ und ist daher bereits kompatibel zu dieser Möglichkeit eine Web-Oberfläche einzurichten. Unabhängig davon können in dieser Tabellenstruktur jedoch auch ohne das Framework WordPress Nutzer verwaltet werden. Wird ein Nutzer gelöscht, werden auch alle Daten dieses Nutzers aus der Modellierungsplattform entfernt. Die Verwaltung von Modellierungsprojekten erfolgt in einer eigenen Tabelle. Jedes Projekt muss mit einem Nutzer verknüpft werden. Projekte können deaktiviert oder gelöscht werden, wodurch auch alle dazugehörigen Modelle und Simulationen ebenfalls entfernt werden.

¹⁵ WordPress Foundation, <https://wordpress.org/>

¹⁶ Prashant Walke, <https://wordpress.org/plugins/wp-user/>

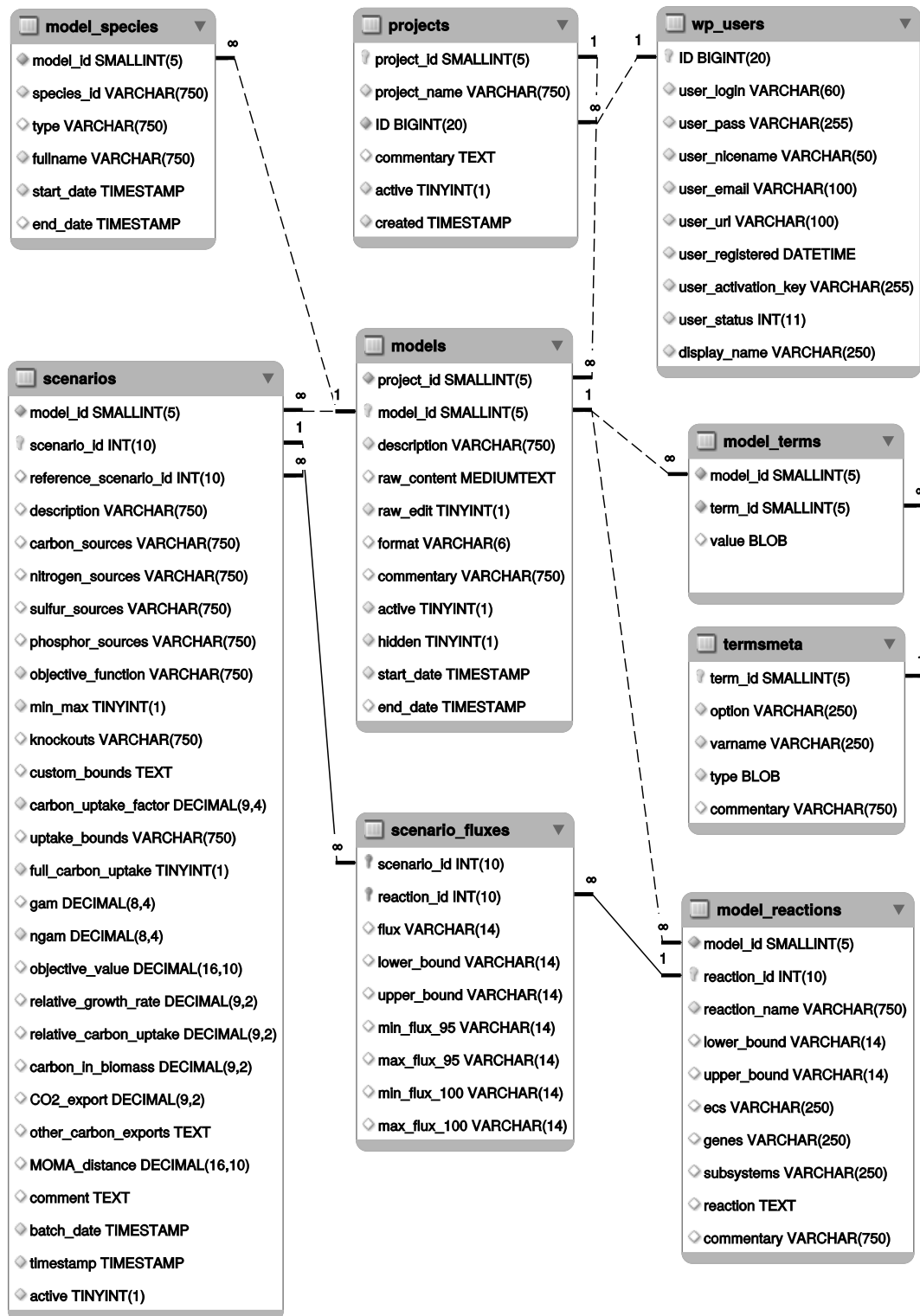


Abbildung 10: Tabellenstruktur der Modellierungsplattform.

Die Verknüpfung der MySQL-Tabellen erfolgt über als Kanten dargestellte Fremdschlüssel: „ID“ (Benutzer), „project_id“ (Projekte), „model_id“ (Modelle), „scenario_id“ (Simulationen), „reaction_id“ (Reaktionen) und „term_id“ (Modellparameter).

Bei der Konzeption der Tabellen wurde viel Wert auf eine effizienten Speicherbedarf gelegt. Durch die konsequente Verwendung von Fremdschlüsseln als Identifikatoren für Benutzer, Modellierungsprojekte, Modelle und Reaktionen wird der Speicherbedarf vermindert sobald mehr als eine Simulation pro Modell durchgeführt wird. Die Flüsse inaktiver Reaktionen in Simulationen (Tabelle „scenario_fluxes“) betragen nicht null sondern werden über den MySQL-spezifischen Wert „NULL“ repräsentiert. Dieser spezifische Wert belegt im InnoDB Speichersubsystem keinen Speicher. Dies trifft auch auf die Beschränkungen von Reaktionsflüssen zu. Hier repräsentiert der Wert „NULL“ die in metano mögliche Definition unbeschränkter Reaktionen. Die Genauigkeit der Reaktionsflüsse und Schranken beträgt 13 Vor- und Nachkommastellen bzw. 12 Vor- und Nachkommastellen bei negativen Werten. Es können also immer bis zu 11 Nachkommastellen gespeichert werden, solange nur eine Vorkommastelle benötigt wird. Sobald mehr als eine Vorkommastelle benötigt wird, reduziert sich die Genauigkeit der Nachkommastellen. Dies ist durch die Verwendung des Datentyps VARCHAR bedingt, der die Werte der Reaktionsflüsse oder Schranken als Zeichenkette anstelle von numerischen Werten speichert. Der Speicherbedarf beträgt dadurch bei Werten, die nicht „NULL“ betragen, 2 – 15 Byte gegenüber einem in äquivalentem DECIMAL(24,12) Wert, welcher konstant 12 Byte Speicherplatz belegt. Der mittlere Speicherbedarf des Datentyps VARCHAR liegt in der Praxis unter dem des Datentyps DECIMAL, da häufig Reaktionsflüsse in wissenschaftlicher Notation (Beispiel: „1.298e-07“ [10 Byte]) und Schranken für irreversible Reaktionen als „0.0“ [4 Byte] gespeichert werden.

In der Modellierungsplattform abgespeicherte Modelle werden nach Änderungen nicht gelöscht, sondern deaktiviert und mit einem Enddatum versehen (Tabelle „models“). Dadurch wird sichergestellt, dass bereits durchgeführte Simulationen stets mit dem zugehörigen Modellstand verknüpft bleiben. Zudem wird durch diese Art der Modellversionierung das Betrachten oder Zurückkehren zu früheren Zuständen eines Modells ermöglicht. Auch die für das Modell definierten Parameter (Kapitel 2.3.2) werden jeweils mit der dazugehörigen Modell-Version verknüpft und bleiben bei Änderungen am Modell für vorherige Modellversionen

erhalten. Als weitere neue Funktion können die Reaktionen der in den Tabellen der Modellierungsplattform gespeicherten Modelle zudem direkt mit Informationen über zugehörige Gene und Subsysteme (zum Beispiel Stoffwechselwege) angereichert werden (Tabelle „model_reactions“).

3.1.3 Verbesserung der automatisierten Genomannotation

Das in dieser Arbeit für die automatisierte Annotation von Genen verwendete Skript „BRannotate“ wurde im großem Umfang überarbeitet (Kapitel 2.1.7). Der ursprüngliche Zweck dieses Skriptes ist dabei unverändert geblieben: die Aufarbeitung von EnzymeDetector-Annotationstabellen [20] hin zu biologisch aussagekräftigen Genomannotationen mit hohen Konfidenz-Werten, die in eindeutigen Gen ↔ EC-Nummer Zuweisungen resultieren. Das Skript berücksichtigt dabei, dass viele prokaryotische Gene oft nur für ein einzelnes Gen-Produkt kodieren. Zu den neuen Funktionen gehört nun auch die gesonderte Betrachtung potentiell multifunktionaler Genloci durch den Abgleich mit bekannten multifunktionalen Enzymen in den Datenbanken UniProt und NCBI. Darüber hinaus ist das Skript nun besser vom Benutzer für den jeweiligen Organismus einstellbar, da weitere Schwellenwerte für Konfidenzwerte und Gewichtungsmöglichkeiten für Annotationsquellen eingerichtet wurden.

3.1.4 Bündelung von Metabolit-Informationen

Die Bündelung von Metabolit-Informationen (Kapitel 2.3.3) war ein entscheidender Faktor für die Weiterentwicklung der hier vorgestellten Modellierungsplattform, da viele Skripte Informationen über die chemische Zusammensetzung von Metaboliten benötigten. Darüber hinaus ist die Vergabe von eindeutigen Namen für Metabolite essentiell für die fehlerfreie Rekonstruktion metabolischer Modelle. Um diese Aufgaben konsistent und schnell bewerkstelligen zu können, wurde auf Grundlage der BKM-react Datenbank [107] eine umfassende, schnell durchsuchbare MySQL-Datenbank erstellt, die nur wenig Speicher benötigt. Die Datenbank erlaubt es eindeutige Metabolitnamen, Metabolit-Synonyme und

Informationen über die chemische Struktur als InChI¹⁷-Zeichenkette abzufragen. Hierbei ist es irrelevant, ob mit einem Synonym oder einem InChI in der Datenbank gesucht wird (Abbildung 11).

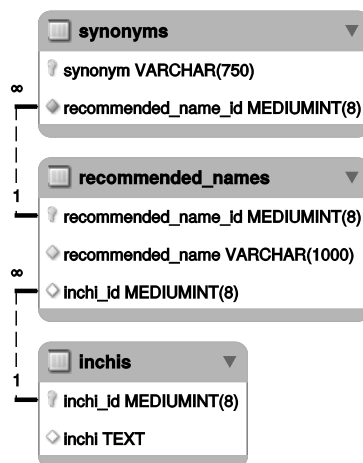


Abbildung 11: Tabellenstruktur der Metabolit-Datenbank.

Die Verknüpfung der MySQL-Tabellen erfolgt über die als Kanten dargestellte Fremdschlüssel „recommended_name“ (eindeutiger Metabolitname) und „inchi_id“ (InChI Identifikator).

3.1.5 Standardisierte Speicherung von Modellierungsparametern

In der Modellierungsplattform können über Konfigurationsdateien Modellierungsparameter für einzelne Modelle eingelesen und in einer Datenbank abgelegt werden. Alternativ können die Parameter auch direkt aus einer Datenbank eingelesen werden (Kapitel 2.3.2).

Die bisher unterstützten Modellierungsparameter umfassen:

- Identifikationsmerkmale für Biomassereaktionen, GAM, NGAM, Transport- und Austauschreaktionen
- Dateien im FASTA-Format, welche die relative Häufigkeit von Aminosäuren in Proteinen und Nukleotiden in DNA und RNA repräsentieren
- Chemische Summenformeln für benutzerdefinierte Metabolite
- Substrate und deren Aufnahmeraten
- Transportreaktionen

¹⁷ International Chemical Identifier, <https://iupac.org/who-we-are/divisions/division-details/inchi/>

- Biomassezusammensetzungen
- Parameter des Energiehaushaltes (GAM und NGAM)

Die Identifikationsmerkmale dienen der korrekten Zuordnung der Rollen „Biomassereaktion“, „GAM-Reaktion“ und „NGAM-Reaktion“ zu den Reaktionen im metabolischen Modell. Ebenso werden hierüber Transport- und Austauschreaktionen identifiziert. Die Identifikationsmerkmale werden als reguläre Ausdrücke interpretiert, daher muss die Rolle einer Reaktion durch ihren Reaktionsnamen repräsentiert werden.

Ausgehend von den Modellierungsparametern bietet die Modellierungsplattform bereits Unterstützung bei der Erstellung metabolischer Modelle an. So können Biomasse-, Transport- und Austauschreaktionen automatisch erstellt werden, Biomassereaktionen auf 1 g Biotrockenmasse normalisiert werden und die GAM nach einem veröffentlichten Protokoll [15] über die Biomassezusammensetzung abgeschätzt werden.

3.1.6 Automatisierte Batch-Simulationen

Die standardisierte Speicherung von Modellparametern vereinfacht die automatisierte Erstellung von einer großen Anzahl (engl.: *batch*) an Szenarien. Die Modellierungsplattform bietet auf Grundlage dieser und weiterer Parameter (Tabelle 1) die Möglichkeit Szenario-Kombinationen zu erstellen und anschließende Simulationen per FBA oder MOMA durchzuführen. Diese Ergebnisse können weiterhin automatisch durch suboptimale und optimale FVA Analysen ergänzt werden. Der Algorithmus zur Durchführung der Simulationen ist robust gegenüber Verbindungsabbrüchen zur verwendeten MySQL-Datenbank oder Abstürzen des ausführendes Systems, da jede Simulation einzeln durchgeführt und gespeichert wird. Nach einer Unterbrechung kann das Programm mit denselben Einstellungen erneut ausgeführt werden, wobei es die noch fehlenden Simulationen automatisch ermittelt und mit diesen fortsetzt. Die Modellierungsplattform berücksichtigt moderne CPU-Architekturen und bietet einen Multiprozessorbetrieb an. Durch Aufteilung der Szenarien und parallele

Durchführung der Simulationen unter Nutzung mehrerer CPUs wird dabei die benötigte Laufzeit verringert. Vor der Erstellung von Szenarien erfolgt eine Abschätzung der maximal möglichen Anzahl von Szenarien bei gegebenen Parametern. Sofern diese dem Nutzer sinnvoll erscheinen, werden die Szenarien erstellt und die Simulationen gestartet. Bei der Erstellung von Szenarien mit Hilfe der Modellierungsplattform wird stets ein Standard- bzw. Referenz-Szenario verlangt. Dieses dient als Basis für Szenarien, in denen nicht alle Parameter variiert werden (in einem solchen Fall werden einzelne Parameter des Standard-Szenarios übernommen) und auch als Referenz für alle weiteren in einer Programminstanz simulierten Szenarien (Kapitel 3.1.7).

Tabelle 1: Kombinierbare Szenarioparameter der Modellierungsplattform.

Die hier aufgelisteten Parameter können für die Erstellung von Szenarien prinzipiell beliebig kombiniert werden. Szenarien werden außerdem anhand dieser Parameter identifiziert. Die Parameter 5 – 10 sind nicht als Modellparameter hinterlegt und müssen daher immer vor der Durchführung von Simulationen festgelegt werden (z.B. durch eine Konfigurationsdatei).

#	Parameter	Modellparameter	Standard-Wert
1	Kohlenstoffquellen	Ja	Benutzerdefiniert
2	Stickstoffquellen	Ja	Benutzerdefiniert
3	Phosphorquellen	Ja	Benutzerdefiniert
4	Schwefelquellen	Ja	Benutzerdefiniert
5	Kohlenstoffaufnahme-Multiplikator	Nein	1x
6	Erzwungene, maximale Kohlenstoffaufnahme	Nein	Deaktiviert
7	Zielfunktion	Nein	Benutzerdefiniert
8	Minimierung / Maximierung der Zielfunktion	Nein	Maximierung
9	Knockouts	Nein	Deaktiviert
10	Benutzerdefinierte Schranken	Nein	Deaktiviert
11	GAM	Ja	Benutzerdefiniert
12	NGAM	Ja	Benutzerdefiniert

Tabelle 2: Komfort-Funktionen der Modellierungsplattform für die Erstellung von Szenarien.

Die Möglichkeit der Kombination dieser Funktionen mit anderen Parametern wurde beschränkt, da in den meisten Modellen ansonsten zu viele Szenario-Kombinationen erstellt werden ($> 10^6$). Andere (nicht aufgezählte) Parameter können immer noch definiert werden, allerdings ist für diese Parameter jeweils nur ein Wert zulässig (z.B. nur eine Zielfunktion oder nur ein GAM- und NGAM-Wert).

Komfort-Funktion	Variierbar mit anderen Parametern (Tabelle 1)
Simulation individueller Knockouts aller im Modell hinterlegten Gene	1, 2, 3, 4, 5, 10
Variation der GAM in benutzerdefinierten Intervallen	1, 5, 12
Variation der NGAM in benutzerdefinierten Intervallen	1, 5, 11
Maximierung der ATP-Produktion (entspricht Maximierung der NGAM)	1, 2, 3, 4
Maximierung des Exports eines Metaboliten (Produktions-Szenario)	1, 5, 10
Variation mehrerer Sätze von benutzerdefinierte Schranken	1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12

Die Modellierungsplattform bietet zudem die Möglichkeit bestimmte häufig benötigte Variationen von Szenarien zu erstellen und zu simulieren (Tabelle Hierunter fällt die Simulation aller Knockouts der im Modell hinterlegten Gene, die Variation der GAM- und NGAM Parameter in benutzerdefinierten Intervallen, die Maximierung der ATP-Produktion oder des Exports eines Metaboliten sowie die Kombination anderer Parameter mit verschiedenen Sätzen von benutzerdefinierten Schranken.

Durch die Möglichkeit zur Definition benutzerdefinierter Schranken berücksichtigt die Modellierungsplattform die Vielfalt und Komplexität unterschiedlicher metabolischer Modelle. Über diesen Parameter können prinzipiell beliebige Szenarien definiert oder angepasst werden. In dieser Arbeit erfolgten zum Beispiel die Einstellung eines Protonenlecks im Modell von *T. thermophilus* HB27 und die Aktivierung zu testender Stoffwechselwege im Model von *S. solfataricus* P2 über diesen Parameter.

3.1.7 Erweiterte Analysefunktionen

Über die Modellierungsplattform stehen Anwendern zusätzliche Analysemethoden zur Verfügung. So werden bei der Durchführung von Batch-Simulationen nicht nur der Wert der Zielfunktion und interne Reaktionsflüsse berechnet, sondern auch gleichzeitig Kennzahlen ermittelt und gespeichert, die für den Vergleich von Szenarien herangezogen werden können. Hierzu gehören der relative Biomassefluss und die relative Kohlenstoffaufnahme im Vergleich zu einem vorher definierten Referenz-Szenario. Zusätzlich werden Kennzahlen über den Verbleib von Kohlenstoff im Modell berechnet. Es wird der Anteil an Kohlenstoff angegeben, der das Modell in Form von CO_2 oder anderer Metabolite verlässt, und es wird der Kohlenstoffanteil angegeben, der in Form der Biomasse im Modell verbleibt. Für einen schnellen Überblick über ein Modell können die Anzahl der im Modell vorhandenen Reaktionen, Gene, Metabolite und gegebenenfalls EC-Nummern ausgegeben werden. Die Reaktionen werden dabei aufgeschlüsselt in Transportreaktionen, metabolische Reaktionen sowie gerichtete und ungerichtete Reaktionen. Die Modellierungsplattform ist durch die Analyse mehrerer vorhandener Simulationen außerdem in der Lage, den benötigten Fluss durch eine Reaktion A für einen festgelegten Fluss durch die Reaktion B vorherzusagen. Hierfür werden verschiedene Regressionen verwendet. Zum Beispiel kann hierüber die NGAM (Reaktion A) berechnet werden, die benötigt wird, um einen experimentell ermittelten Biomassefluss (Reaktion B) einzustellen. Der berechnete Wert der betrachteten Reaktion A ist dabei umso genauer, je mehr Simulationen analysiert werden können. Die Modellierungsplattform berücksichtigt alle Simulationen desselben Modells die sich ausschließlich hinsichtlich dieser Reaktionsflüsse unterscheiden (im konkreten Beispiel Simulationen mit unterschiedlichen NGAM-Werten, die ansonsten identische Simulationsparameter aufweisen).

Darstellung signifikant veränderter Reaktions- und Metabolitflüsse als Scatterplot

Die vorhergesagten Flüsse von Simulationen der Modellierungsplattform können paarweise als Scatterplot gegenübergestellt werden (Abbildung 12). Die automatisierte Darstellung von Reaktionsflüssen als vergleichender Scatterplot wurde bereits früher realisiert [118], jedoch in dieser Arbeit aus Gründen der einfacheren Anwendungsintegration neu entwickelt. In der Modellierungsplattform existiert darüber hinaus die Möglichkeit sich nicht nur a) die Reaktionsflüsse, sondern auch b) die Metabolit-Flüsse oder c) die minimalen Metabolit-Flüsse anzeigen zu lassen. Die minimalen Metabolitflüsse werden nach Bedarf über suboptimale oder optimale MFM (Kapitel 2.2.7) berechnet. Die Skalierung des Graphen erfolgt automatisch in doppelt-logarithmischer Auftragung. Bei der Darstellung der Reaktionsflüsse existieren zwei Methoden, um signifikante Unterschiede zwischen den zwei Simulationen zu ermitteln. Bei der Darstellung von (minimalen) Metabolitflüssen existiert hingegen nur eine Methode. Die für alle drei Arten von Flüssen gültige Methode berechnet die Signifikanz auf Grundlage der relativen Flussverhältnisse. Liegt das gegebene Verhältnis eines Flusses zwischen zwei Simulationen über einem festgelegten Schwellenwert, so wird eine Veränderung als signifikant angesehen. Die andere Möglichkeit der Ermittlung signifikant veränderter Reaktionsflüsse basiert auf suboptimalen oder optimalen FVA-Ergebnissen (Kapitel 2.2.2), welche idealerweise bereits in der Datenbank vorliegen. Demnach sind zwei Reaktionsflüsse signifikant verändert, wenn sich die mittels FVA bestimmten Intervalle dieser Flüsse nicht überlappen können, das heißt wenn beide Reaktionen nicht denselben Fluss annehmen können [118]. Allerdings kommt es oft vor, dass in Simulationen, die sich deutlich im Fluss durch die Biomassereaktion unterscheiden, der Großteil aller Reaktionen als signifikant verändert angegeben werden. Die Ursache hierfür liegt direkt im unterschiedlichen Fluss durch die Biomassereaktion, denn alle Reaktionen die ausschließlich für die Synthese von Biomassekomponenten benötigt werden (oft der Großteil des aktiven Modells) kann dadurch niemals denselben Fluss annehmen. Für alle Arten

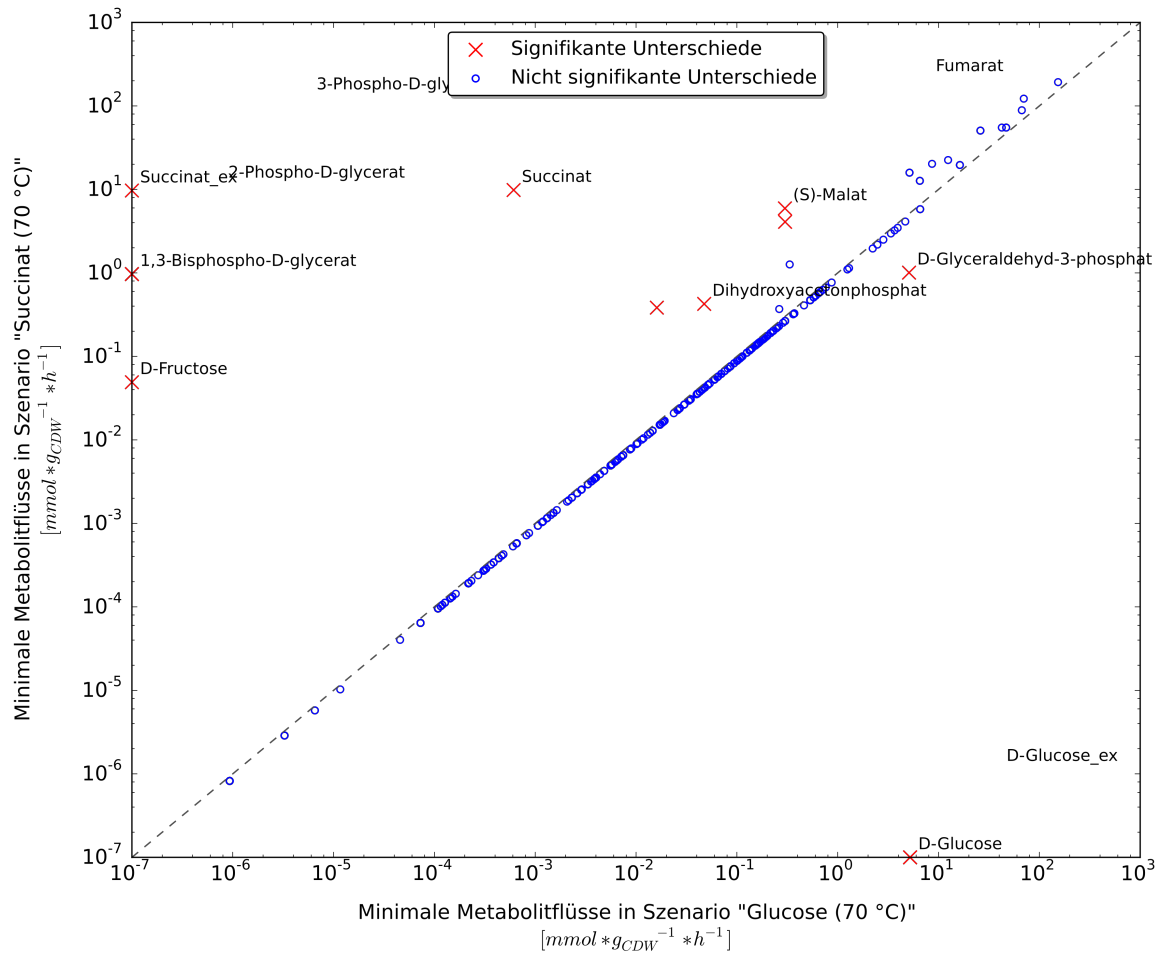


Abbildung 12: Vergleich von minimalen Metabolitflüssen zwischen zwei Simulationen.

Abgebildet ist der Vergleich der minimalen Metabolitflüsse beim modellierten Wachstum des Organismus *T. thermophilus* HB27 auf Glucose und 3-Hydroxybutanoat als Kohlenstoffquelle. Die Ermittlung signifikanter Metabolite erfolgte über suboptimale MFM. Die Abbildung wurde vollständig automatisch erstellt.

der Ermittlung signifikanter Unterschiede wurde daher ermöglicht, dass Reaktionen und Metabolite als nicht signifikant verändert angesehen werden, wenn die Unterschiede allein auf einen unterschiedlichen Fluss durch die Biomassereaktion zurückzuführen sind. Hierfür kann ein benutzerdefinierter Toleranzwert zwischen 0 und 1 angegeben werden (entspricht 0 – 100 %). Basierend auf diesem Wert und dem Verhältnis der Biomasseflüsse beider Simulationen wird ein Verhältnis-Bereich berechnet, in dem Reaktions- oder

Metabolitflüsse nicht liegen dürfen, um als signifikant verändert zu gelten. Beispiel: Bei einem Verhältnis der Biomasseflüsse von 2,0 (ein Szenario weist einen doppelt so hohen Biomassefluss auf wie ein anderes) und einem Toleranzwert von 0,95 werden Flüsse, die sich in einem Verhältnis von 1,9 – 2,1 verändert haben, als nicht signifikant verändert angesehen. Im Scatterplot entspricht dies einem Band, dass parallel zur Winkelhalbierenden und zentral durch die Biomassereaktion verläuft und eine Breite entsprechend des Toleranzwertes besitzt.

Reaktionen und Metabolite, die als signifikant verändert gelten, können unterschiedlich gefärbt und automatisch beschriftet werden. Die Beschriftung kann überlappend oder nicht-überlappend erfolgen. Bei wenigen signifikanten Punkten müssen Graphen, die mittels nicht-überlappender Beschriftung annotiert wurden, meist nicht weiter bearbeitet werden. Bei vielen signifikanten Punkten ist eine manuelle nachträgliche Bearbeitung meist angebracht. Alternativ können beim Export eines Graphen im SVG-Format die Beschriftungen ausgelassen werden, da bei der Betrachtung der Grafik in einem Webbrowser die Namen der einzelnen Punkte durch Überfahren mit dem Maus-Cursor interaktiv angezeigt werden.

Elementzentrische Flussanalyse

Durch die Bündelung von Metabolit-Informationen war es möglich, die metabolitzentrische Analyse auf Grundlage der Split-ratio Analyse und des Visualisierungs-Tools AMEBA (Kapitel 2.2.6) so zu erweitern, dass die relativen Metabolitflüsse in Flüsse eines chemischen Elements umgerechnet werden (Kapitel 2.3.6). Hierdurch können zum Beispiel Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelflüsse in einem Modell leicht nachvollzogen werden. Flüsse durch Metabolite, die das vorgegebene Element nicht beinhalten, werden automatisch aus der Darstellung entfernt. Die bisher anwendbaren Konfigurationsmöglichkeiten von AMEBA (wie Schwellenwerte für relative Mindestflüsse) bleiben funktionell und werden auf die Elementflüsse übertragen.

Die Darstellung von Kohlenstoffflüssen erlaubt Modellierern eine schnelle Orientierung bei der Analyse des Zentralstoffwechsels eines unbekannten Modells

oder der Modellierung des Wachstums auf einer neuen Kohlenstoffquelle (Abbildung 13). Auch die Darstellung von Stickstoff- und Schwefelflüssen erleichtert die Charakterisierung eines Modells. Aus Abbildung 14 ist zum Beispiel ersichtlich, dass der aufgenommene Schwefel im Modell von *T. thermophilus* zu 93 % in Form der Aminosäuren Cystein und Methionin in die Biomasse eingeht. Die Darstellung von Phosphorflüssen hat sich bisher als problematisch erwiesen, da durch die universale Verwendung von ATP und anderen Nukleotiden im Modell deutlich höhere Phosphorflüsse auftreten. Diese können in keine sinnvolle Relation zu der Aufnahme von phosphorhaltigen Verbindungen gebracht werden. Auch die Darstellung von Sauerstoffflüssen ist durch den in organischen Molekülen gebundenen Sauerstoff problematisch. Je nach Bedarf können ansonsten beliebige Elementflüsse berechnet und angezeigt werden. Denkbar ist z.B. auch die Darstellung mineralabhängiger Kofaktor-Biosynthesewege durch Darstellung der Flüsse von Eisen, Cobalt oder Molybdän.

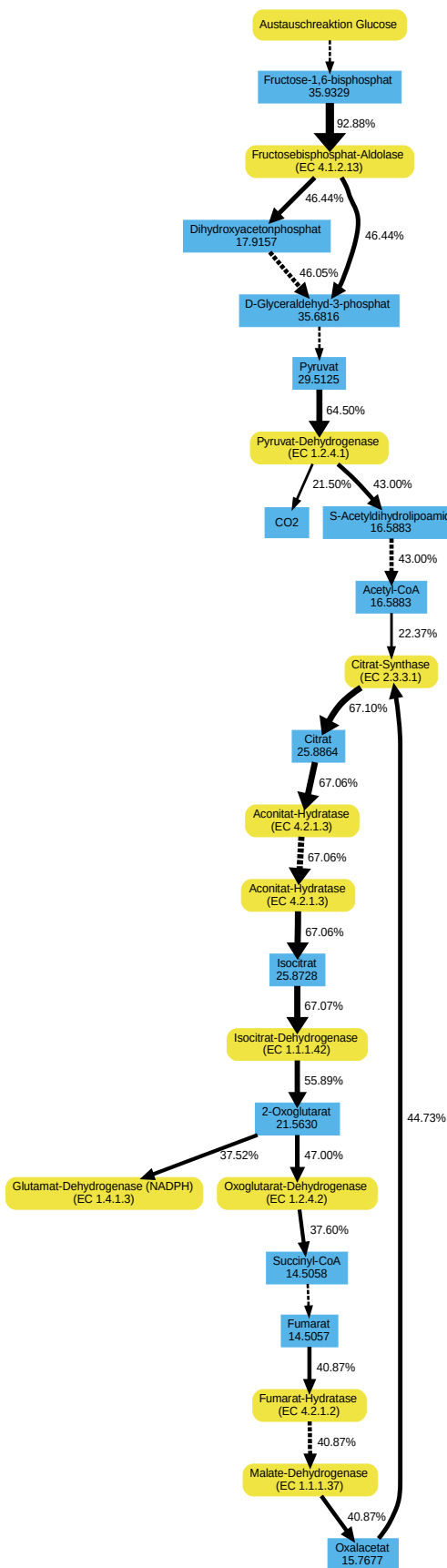


Abbildung 13: Elementzentrische Analyse des Kohlenstoffs beim modellierten Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf Glucose.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Kohlenstoffflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in $\text{mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Kohlenstoffflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Kohlenstoff, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 15 % werden nicht angezeigt. Die Abbildung wurde vollständig automatisch erstellt.

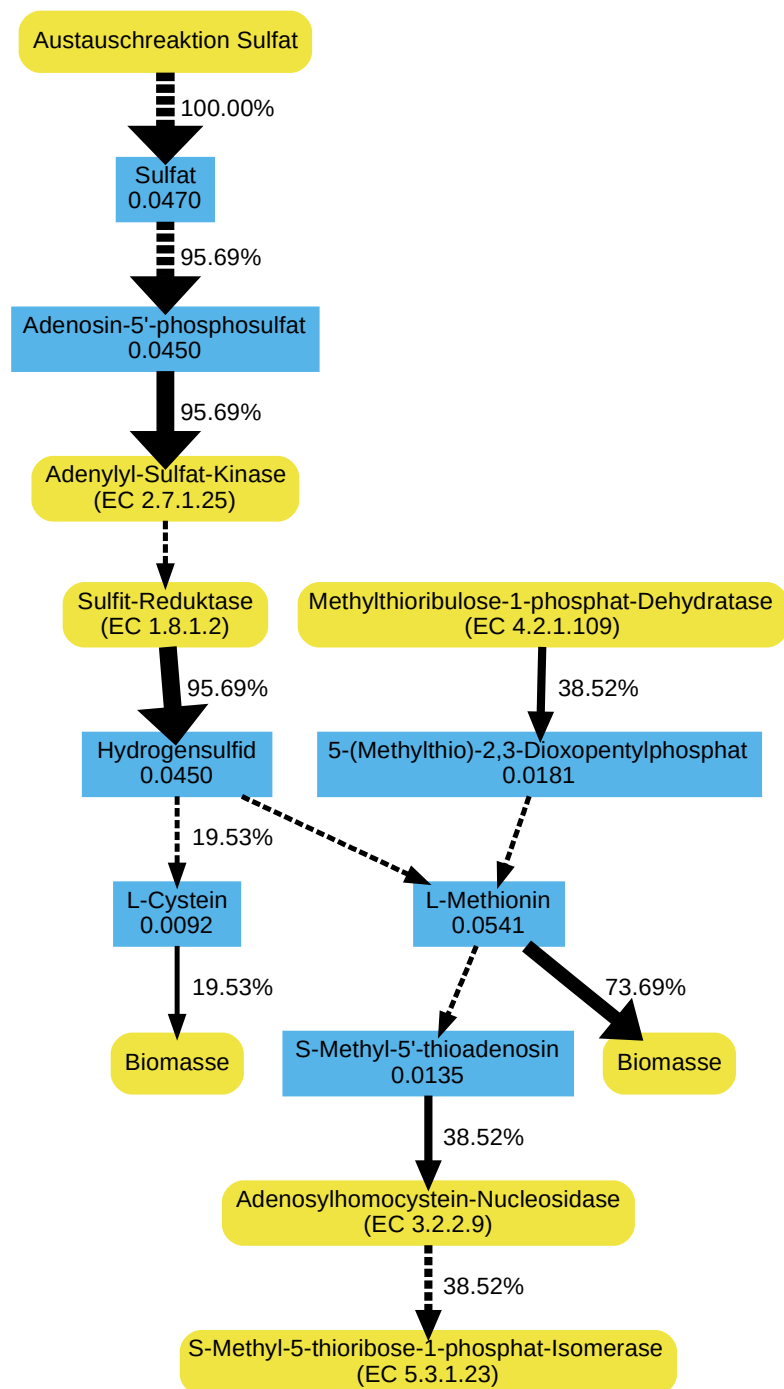


Abbildung 14: Elementzentrische Analyse des Schwefels beim modellierten Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf Glucose.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Schwefelflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in $\text{mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Schwefelflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Schwefel, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 5 % werden nicht angezeigt. Die Abbildung wurde vollständig automatisch erstellt.

3.2 Modellierung von *Thermus thermophilus*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein metabolisches Modell des thermophilen Bakteriums *Thermus thermophilus* HB27 verwendet, um den Stoffwechsel des Bakteriums beim Wachstum auf verschiedenen Substraten sowie bei unterschiedlichen Wachstumstemperaturen näher zu charakterisieren. Dieses Modell wurde 2013 entwickelt [73] und seitdem optimiert. Eine Auflistung aller im metabolischen Modell von *T. thermophilus* HB27 verwendeten Abkürzungen findet sich im Anhang (Anhang 4). Im folgenden Kapitel werden die Änderungen des in dieser Arbeit vorgestellten Modells gegenüber dem Ausgangsmodell beschrieben. Außerdem wird das aktuelle Modell mit einem anderen kürzlich publizierten Modell für *T. thermophilus* HB27 [74] verglichen, um die quantitativen und qualitativen Fortschritte dieser Arbeit zu verdeutlichen.

3.2.1 Erweiterung und Validierung des Modells

Das Ausgangsmodell von *Thermus thermophilus* HB27 konnte qualitativ verbessert und erweitert werden. Hierzu wurden redundante Reaktionen aus dem Modell entfernt, das Modell an neue experimentelle Ergebnisse angepasst und neue Reaktionen sowie temperaturabhängige Parameter zum Modell hinzugefügt. Die meisten der neu hinzugefügten Reaktionen sind relevant für die Fettsäurebiosynthese (14 Reaktionen), die Polyaminbiosynthese (12 Reaktionen) und Transportprozesse (10 Reaktionen). Neben den neu hinzugefügten Reaktionen musste außerdem die Reaktionsrichtung der NAD(P)H-Transhydrogenase (Abbildung 15A) in der Atmungskette des Modells verändert werden. Diese Reaktion wurde auf die Synthese von NADPH beschränkt werden, da dies die physiologische Funktion dieses Enzyms ist [132,133]. Ebenfalls aktualisiert wurde die Biomassezusammensetzung für das Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle. Diese Zusammensetzung konnte an neue experimentelle Ergebnisse der Arbeitsgruppe (Carolin Nienhagen, persönliche Mitteilung, 2014) angepasst werden (Tabelle 3). Die experimentellen Daten zeigen, dass die Biomasseanteile von Proteinen und RNA bisher deutlich

überschätzt wurden, während der Anteil der in der Gattung *Thermus* häufig vorkommenden Polyhydroxyalkanoate bisher unterschätzt wurde [75,134,79]. Mittels weiterer experimenteller Ergebnisse konnte das Modell zudem auch an physiologische Daten für das Wachstum auf den Kohlenstoffquellen Glucose, Glycerol, Succinat, Phenylacetat und 3-Hydroxybutanoat angepasst werden (Carolin Nienhagen, persönliche Mitteilung, 2014). Hierunter fallen Substrataufnahmeraten, Wachstumsraten und Werte für die Integration von Kohlenstoff aus der jeweiligen Kohlenstoffquelle in die Biomasse.

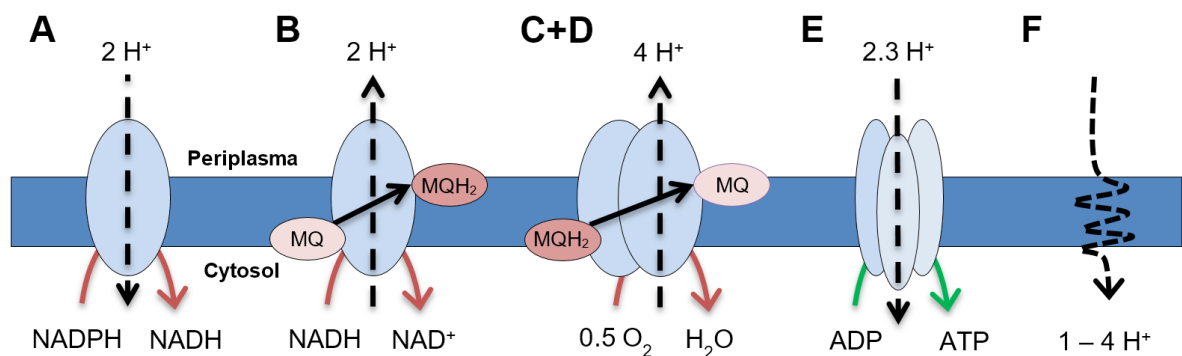


Abbildung 15: Aktualisiertes Schema der Atmungskette in *T. thermophilus*.

(A) Eine Transhydrogenase ermöglicht die Konversion von NADH zu NADPH unter Verbrauch zweier Protonen aus dem periplasmatischen Raum. (B) Eine NADH-Dehydrogenase transferiert Elektronen auf den Elektronen-Überträger Menachinon und transportiert bis zu 2 Protonen pro veratmetem Sauerstoffatom in den periplasmatischen Raum. (C) Menachinol-Oxidasen und Cytochrom-Oxidasen transferieren Elektronen des reduzierten Menachinols auf den finalen Elektronen-akzeptor Sauerstoff und transportieren bis zu 4 weitere Protonen in den periplasmatischen Raum. (D) Die ATP-Synthese erfolgt über ATPase-vermittelten Rückstrom von Protonen in das Cytosol, wobei im Mittel 2,3 Protonen pro Molekül ATP benötigt werden. (E) Eine temperaturabhängige Diffusion von Protonen über die Zellmembran wirkt der respiratorischen Aktivität entgegen und führt zum Verlust von bis zu vier Protonen pro veratmetem Sauerstoffatom.

(Abbildung aktualisiert ausgehend von [73])

Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell von *T. thermophilus* HB27 (im Folgenden „aktuelles Modell“) weist den größten Reaktionsumfang, die meisten implementierten experimentellen Daten, die detaillierteste Biomassezusammensetzung sowie neue temperaturabhängige Parameter auf, die in den anderen Modellen des Organismus [73,74] nicht zu finden sind (Tabelle 4).

Tabelle 3: Aktualisierte Biomassezusammensetzung von *T. thermophilus* HB27 für das Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Die Biomasseanteile für DNA, RNA Proteine und Lipide wurden in der Arbeitsgruppe experimentell bestimmt (Carolin Nienhagen, persönliche Mitteilung, 2014).

Biomassefraktion	Relativer Masseanteil [%]		Referenzen
	Stark (2013)	Diese Arbeit	
DNA	2,07	2,96	C. Nienhagen (2014)
RNA	18,45	5,34	C. Nienhagen (2014)
Proteine	57,31	49,56	[74]
Lipide	10,15	12,36	C. Nienhagen (2014)
Carotinoide	0,04	0,15	[135]
Peptidoglykan	1,42	1,42	[136,137]
Sekundäre Zellwandpolymere	0,23	0,23	[62,138]
Polyamine	1,20	0,40	[46,48,17]
Löslicher Pool	4,34	4,33	[119,139]
Glykogen	3,00	3,00	[140,141]
Polyhydroxyalkanoate	-	20,36	[75,79,134]

Die temperaturabhängigen Parameter, die im Rahmen dieser Arbeit zu dem Modell hinzugefügt wurden, ermöglichen nun neben der bisher modellierten Wachstumstemperatur von 70 °C auch Vorhersagen für eine Wachstumstemperatur von 80 °C. Hierfür wurden eine Biomassereaktion für das Wachstum bei 80 °C sowie temperaturabhängige Flussraten für ein bereits im Modell vorhandenes Protonenleck (Abbildung 15E) in das Modell integriert. Die Biomassezusammensetzung für 80 °C basiert auf der Biomassezusammensetzung des Ausgangsmodells für 70 °C. Ausgehend von der Biomassezusammensetzung für 70 °C wurden mittels Literaturrecherche Unterschiede in der Biomassezusammensetzung zwischen beiden Wachstumstemperaturen (70 °C und 80 °C) ermittelt und eine neue Biomassereaktion erstellt. Die Recherche ergab, dass sich Zusammensetzung und teilweise der Biomasseanteil von Lipiden und Polyaminen mit steigender Wachstumstemperatur verändert (Tabelle 5). So steigt der Anteil an langen und verzweigtkettigen Fettsäuren in den Lipiden von *T. thermophilus* bei erhöhter Wachstumstemperatur [33]. Außerdem wurde der relative Biomasseanteil der

Tabelle 4: Unterschiede im Umfang verschiedener Modelle von *Thermus thermophilus* HB27.

Das Modell iTT548 [74] und das Modell von Stark (2013) [73] wurden bereits veröffentlicht.

	iTT548 (2014)	Stark (2013)	Diese Arbeit
Umfang			
Reaktionen	796	1181	1193
Gene (Anteil aller Gene)	548 (25 %)	668 (30 %)	605 ^a (27 %)
Metabolite ^b	635	992	987
Neue Eigenschaften	-	Protonen-Leckfluss, explizite GAM-Reaktion	Protonen-Leckfluss, explizite GAM-Reaktion, temperaturabhängige Parameter
Experimentelle Daten ^c	Wachstumsraten für Glucose und ein Komplexmedium	Wachstumsrate für Glucose, Kohlenstoffbilanz für Glucose, Aufnahmeraten für Glucose,	Wachstumsraten für 5 Substrate ^d , Kohlenstoffbilanz für 5 Substrate ^d , Aufnahmeraten für 5 Substrate ^d
Biomassezusammensetzung			
Proteine	Experimentell bestimmt, Literatur	Experimentell bestimmt	Experimentell bestimmt, Literatur
Lipide	Literatur (<i>T. aquaticus</i>)	Experimentell bestimmt	Experimentell bestimmt
DNA	Literatur (<i>E. coli</i>)	Experimentell bestimmt	Experimentell bestimmt
RNA	Literatur (<i>E. coli</i>)	Experimentell bestimmt	Experimentell bestimmt
Polyhydroxyalkanoate	-	Literatur	Literatur
Löslicher Pool	Literatur (<i>E. coli</i>)	Literatur (<i>E. coli</i>)	Literatur (<i>E. coli</i>)
Biosynthese-Stoffwechselwege			
Membranlipide	Teilweise vorhanden	Vollständig vorhanden	Vollständig vorhanden
Peptidoglykan-Zusammensetzung	Teilweise vorhanden	Vollständig vorhanden	Vollständig vorhanden
Polyamine	3 von 16 implementiert	4 von 16 implementiert	8 von 16 implementiert

^a Gegenüber dem Modell von Stark (2013) wurden der Algorithmus zur Zuordnung von Genen und Reaktionen verändert.

^b Keine Unterscheidung nach Kompartimenten: Metaboliten werden nur einmal gewertet, selbst wenn sie im Modell mehrfach auftauchen.

^c Minimalmedien mit einzelner Substrat als alleiniger Kohlenstoffquelle.

^d Inklusive Glucose als Substrat.

Lipide für 80 °C erhöht, da dieses Phänomen üblich für Vertreter der Gattung *Thermus* ist [142]. Es wurden die Werte des nahe verwandten Organismus *T. aquaticus* verwendet, da dieser ebenfalls eine optimale Wachstumstemperatur von 70 °C und eine sehr ähnliche Lipidzusammensetzung aufweist [143,144]. Die Zusammensetzung der Polyamine verändert sich bei steigender Temperatur zugunsten des sehr langkettigen Homocaldopentamin und des stark verzweigten Tetrakis-(3-aminopropyl)-ammonium [47,49].

Tabelle 5: Unterschiede in der Biomassezusammensetzung für das Wachstum von *T. thermophilus* HB27 bei unterschiedlichen Temperaturen.

		Temperatur		Referenzen
		70 °C	80 °C	
Lipide				
relativer Biomassenanteil [%]		12,4	17,9	[33,143,144]
Fettsäure- Zusammensetzung [%]	iso-14:0	0,5	0,5	
	iso-15:0	27,6	21,7	
	anteiso-15:0	1,4	1,4	
	iso-15:0OH	2,7	2,1	
	iso-16:0	9,8	9,8	
	16:0	5,6	5,6	
	16:1	1,1	1,1	
	iso-17:0	40,2	45,6	
	anteiso-17:0	2,2	2,2	
	iso-17:0OH	8,9	10,1	
Polyamine				
relativer Biomassenanteil [%]		0,40	0,40	[47,49]
Zusammensetzung [%]	Norspermidin	9,1	5,2	
	Spermidin	17,2	9,9	
	Norspermin	19,0	19,0	
	Thermospermin	35,2	35,2	
	Homospermin	8,4	8,4	
	Caldopentamin	2,2	4,4	
	Homocaldopentamin	5,0	9,9	
	TKAPA *	3,9	7,9	

* Tetrakis-(3-aminopropyl)-ammonium

Durch die Änderungen an der Biomassezusammensetzung verändert sich auch das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff in der modellierten Biomasse zwischen beiden Temperaturen. Es steigt von etwa 6,0 bei 70 °C auf 6,3 bei 80 °C an. Die Flussraten für das Protonenleck, welches im Modell den Verlust an osmotischem Potential durch den ATPase-unabhängigen Rückstrom von Protonen

während der Atmung repräsentiert, waren für die Wachstumstemperatur von 70 °C bereits im Ausgangsmodell implementiert. Nach weiterer Recherche konnte nun auch eine Flussrate für die Wachstumstemperatur von 80 °C in das Modell integriert werden [145]. Die Flussraten des Protonenlecks entsprechen für 70 °C bzw. 80 °C etwa 2,8 bzw. 4,2 Protonen pro veratmetem Sauerstoffatom. Im Rahmen der Erweiterung des Modells wurde ebenfalls der Algorithmus zur automatischen Zuordnung von Genen und Reaktionen aktualisiert und aktuelle EnzymeDetector-Annotationstabellen verwendet. Die Zahl der im Modell implementierten Gene ist dadurch gesunken.

Der Umfang aktuellen Modells von *T. thermophilus* HB27 ist gegenüber einem anderen kürzlich publizierten (*i*TT548) [74] deutlich größer (Tabelle 4). Auch die Biomassezusammensetzung des aktuellen Modells ist detaillierter gegenüber dem Modell *i*TT548, da

1. die relativen Biomasseanteile an Lipiden, DNA und RNA für das aktuelle Modell experimentell ermittelt wurden (Carolyn Nienhagen, persönliche Mitteilung, 2014),
2. die in der Gattung *Thermus* verbreiteten Polyhydroxyalkanoate [134] nicht in der Biomasse des Modells *i*TT548 vorhanden sind,
3. die häufigsten Glykolipide der Zellmembran von *T. thermophilus* HB27 [143,146] im Modell *i*TT548 fehlen,
4. Phenylacetat, welches in einem Viertel aller Monomere des Peptidoglykans von *T. thermophilus* vorkommt [136], sowie sekundäre Zellwandpolymere [62,138] im Modell *i*TT548 fehlen,
5. Polyamine nicht Bestandteil der Biomasse im Modell *i*TT548 sind.

Im Modell *i*TT548 konnten weiterhin Lücken in der Atmungskette sowie einem Biosyntheseweg für Polyaminen entdeckt werden. Für diese Analyse wurden auf Grundlage der zur Publikation des Modells *i*TT548 beigefügten SBML¹⁸-Datei eigene Simulationen durchgeführt. Aus diesen war überraschenderweise ersichtlich, dass ein wichtiges Enzym der Atmungskette des Organismus, die

¹⁸ Systems Biology Markup Language, <http://sbml.org/Documents/Specifications>

Transhydrogenase (Abbildung 15), im Modell iTT548 vollständig fehlt. Dies hat große Auswirkungen auf den modellierten Energiestoffwechsel, da die Transhydrogenase unter Rückstrom extrazellulärer Protonen die Umwandlung von NADH zu NADPH katalysiert und somit klassischerweise eine bedeutende Regulationsmöglichkeit für anabole Stoffwechselwege darstellt [132,133]. Dieses Enzym produziert im aktuellen Modell etwa ein Drittel des gesamten NADPH (Kapitel 3.2.2.1). Dahingegen werden im Modell iTT548 etwa 67 % des NADPH über den Abbau von Format regeneriert, wofür *de novo* synthetisiertes Glycin abgebaut werden muss (82 % des gesamten Glycins). Diese Variante der NADPH-Regeneration ist äußerst fragwürdig, da sie äußerst ineffizient ist und die annotierte Format-Dehydrogenase in *T. thermophilus* HB27 (TT_P0138) die höchsten Sequenzidentitäten zu NADH-spezifischen Enzymen aus *E. coli* K12 aufweist (30% Identität und e-Value von 10^{-65} zu fdhF aus *E. coli* K12). Im Kontext der Atmungskette fiel zudem auf, dass die Stöchiometrie der ATPase im Modell iTT548 auf vier Protonen pro produziertem Molekül ATP eingestellt ist und somit in diesem Modell deutlich überschätzt wird (Abbildung 15) [145]. Damit werden in diesem Modell zentrale Parameter der Atmungskette nicht mit der höchstmöglichen Genauigkeit modelliert und Fehler in Bezug auf den Energiestoffwechsel toleriert. Weiterhin wurde getestet ob Metabolite, die im aktuellen Modell Biomassekomponenten darstellen (Tabelle 3 und 5) und gleichzeitig im Modell iTT548 vorhanden sind, auch im letzteren Modell aktiv werden können. Dabei wurde beobachtet, dass die Polyamine Spermin und Spermidin im Modell iTT548 nicht produziert werden können, da aufgrund einer Lücke im entsprechenden Biosyntheseweg das Intermediat 5-Methylthio-D-Ribose nicht abgebaut werden kann. Außerdem wurden im Modell iTT548 zwei thermodynamisch verbotene Zyklen (Kapitel 2.2.4) identifiziert, da sowohl NAD⁺- als auch NADP⁺-abhängige Reaktionen der Enzyme L-Proline Oxidoreductase (EC 1.5.1.2) und L-Glutamat Oxidoreductase (EC 1.4.1.3) vorhanden sind.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell ist das bisher umfangreichste Modell, das für thermophile Prokaryoten veröffentlicht wurde. Aufgrund des hohen Reaktionsumfangs, der detaillierten Biomassezusammensetzung, neuer

temperaturabhängiger Parameter und der sorgfältig recherchierten Atmungskette ist dieses Modell zudem höchstentwickelte aller Modelle von *T. thermophilus* HB27. Es produziert daher die momentan zuverlässigsten Vorhersagen und kann die experimentelle Versuchsplanung effizienter unterstützen als andere Modelle.

3.2.2 Charakterisierung des Stoffwechsels für verschiedene Kohlenstoffquellen

Das metabolische Modell von *T. thermophilus* HB27 ist im Rahmen dieser Arbeit an experimentelle Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe angepasst worden, was die Validierung des Modells gegenüber diesen Daten und gleichzeitig die Analyse des Stoffwechsels auf den entsprechenden Kohlenstoffquellen ermöglicht. Es wurden zur Verfügung stehende Substrataufnahmeraten für die Kohlenstoffquellen Glucose, Glycerol, Succinat, Phenylacetat und 3-Hydroxybutanoat in das Modell integriert und die NGAM an die experimentell ermittelte Integration von Kohlenstoff aus den Kohlenstoffquellen in die Biomasse (im Folgenden: Kohlenstoffbilanz) angepasst. Anschließend wurden Simulationen mit diesen Parametern durchgeführt (Tabelle 6).

Der Vergleich der Modellierungsergebnisse mit den experimentellen Daten zeigt, dass das Modell nach der Integration von Substrataufnahmeraten und Kohlenstoffbilanzen nun Biomasseflüsse vorhersagt, die sehr nahe an den experimentell beobachteten Wachstumsraten liegen. Die einzige Ausnahme hiervon ist das modellierte Wachstum auf Glycerol als alleiniger Kohlenstoffquelle. Die Wachstumsrate auf diesem Substrat wird vom Modell noch unterschätzt (Kapitel 3.2.2.2). Allerdings liegen alle vorhergesagten Wachstumsraten deutlich näher an den experimentellen Erkenntnissen, als dies im Ausgangsmodell der Fall war (Anhang 5), sodass das Modell für diese Substrate als validiert gelten kann.

Im Folgenden wird das modellierte Wachstum auf Glucose als Referenz verwendet, um das *in silico* Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf den

Kohlenstoffquellen Succinat, Glycerol, Phenylacetat und 3-Hydroxybutanoat erstmals detailliert zu betrachten.

Tabelle 6: Vergleich von Modellvorhersagen mit zur Verfügung gestellten experimentellen Daten bezüglich des Wachstums von *T. thermophilus* HB27 auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Das Wachstumsverhalten von *T. thermophilus* HB27 wurde für eine Wachstumstemperatur von 70 °C für verschiedene Kohlenstoffquellen untersucht (Carolin Nienhagen, persönliche Mitteilung, 2014). Gelistet sind die Integration von Kohlenstoff aus den Kohlenstoffquellen in die Biotrockenmasse (Kohlenstoffbilanz), Substrataufnahmeraten und spezifische Wachstumsraten während der logarithmischen Wachstumsphase. Gegenübergestellt sind die Modellvorhersagen für die Integration von Kohlenstoff aus den Kohlenstoffquellen in die Biotrockenmasse sowie für Wachstumsraten (Biomasseflüsse). Ebenfalls aufgeführt sind die angepassten Werte für die wachstumsunabhängigen Energiekosten (NGAM) im Modell.

Substrat	Experimentelle Ergebnisse			Modellierung	
	Kohlenstoff-bilanz [%]	Substrat-aufnahmerate [mmol · g _{BTM} ⁻¹ · h ⁻¹]	Spezifische Wachstumsrate [h ⁻¹]	Biomassefluss [h ⁻¹]	NGAM [mmol · g _{BTM} ⁻¹ · h ⁻¹]
Glucose	57,86 ± 2,43	6,43 ± 0,31	0,497 ± 0,002	0,49	4,16
Succinat	35,75 ± 3,85	14,31 ± 4,68	0,456 ± 0,084	0,43	14,82
Glycerol	38,72 ± 4,98	13,29 ± 3,20	0,344 ± 0,028	0,24	41,60
Phenylacetat	36,79 ± 0,95	3,66 ± 0,22	0,240 ± 0,008	0,22	19,85
3-Hydroxybutanoat	27,84 ± 1,17	3,87 ± 0,21	0,096 ± 0,001	0,08	14,80

3.2.2.1 Glucose

Das modellierte Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf der alleinigen Kohlenstoffquelle Glucose wurde bereits auf Grundlage des Ausgangsmodell eingehend charakterisiert [73]. Allerdings wurden seit diesem Zeitpunkt mehrere Änderungen am Modell vorgenommen, sodass diese Ergebnisse aktualisiert bzw. bestätigt werden müssen. Zu den tiefgreifenden Änderungen gehören insbesondere eine neue Glucoseaufnahmerate, Veränderungen in der Atmungskette des Modells (Abbildung 15) sowie die Anpassung der NGAM.

Wachstumsrate

Im Gegensatz zu der vom Ausgangsmodell vorhergesagten Wachstumsrate von 0,16 h⁻¹ stimmt die vom aktuellen Modell vorhergesagte Wachstumsrate von

0,49 h⁻¹ deutlich besser mit experimentellen Daten überein. Dieses trifft sowohl auf die in der eigenen Arbeitsgruppe ermittelte Wachstumsrate (Carolin Nienhagen, persönliche Mitteilung, 2014) von 0,50 h⁻¹ (Tabelle 6) als auch auf die in der Literatur vorhandenen Werte von 0,17 h⁻¹ – 0,50 h⁻¹ [147] zu.

P/O-Verhältnis und Atmung

Der Begriff Phosphor-Sauerstoff-Verhältnis (P/O-Verhältnis) beschreibt die Anzahl gebildeter Moleküle ATP pro veratmetem Sauerstoffatom. Dieses Verhältnis ergibt sich für unterschiedliche Substrate generell aus den stöchiometrischen Koeffizienten der Reaktionen in der Atmungskette eines Organismus [148]. Das P/O-Verhältnis, und damit gewissermaßen die Effizienz der Atmungskette, steigt, wenn pro oxidiertem Reduktionsäquivalent mehr Protonen in das Periplasma transportiert werden oder die ATP-Synthase weniger Protonen für die Synthese eines Moleküls ATP benötigt. Für *T. thermophilus* HB27 ist es sinnvoll von einem kombinierten P/O-Verhältnis zu reden, da sowohl NADH als auch Succinat – also mehrere Substrate – als Elektronendonatoren dienen. Gegenüber dem ursprünglichen Modell, welches ein kombiniertes P/O-Verhältnis von 1,3 berechnet, sagt das aktuelle Modell den Wert von 2,4 voraus. Dieses P/O-Verhältnis liegt eher in dem Bereich von 2 – 3, welcher für ein Bakterium erwartet wird, das sowohl NADH als auch Succinat oxidieren kann [148,149]. Durch die am Modell vorgenommen Änderungen werden daher nicht nur Aufnahme- und Wachstumsraten besser vorhergesagt, sondern auch die internen Flüsse der Atmungskette.

Kohlenstoffbilanz und Zentralstoffwechsel

Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell von *T. thermophilus* HB27 wurde auf dieselbe Kohlenstoffbilanz angepasst wie das Ausgangsmodell. Beide Modelle stimmen daher mit der experimentell ermittelten Kohlenstoffbilanz von etwa 57 % überein (Tabelle 6). Der restliche Anteil von etwa 43 % Kohlenstoff, welcher aus dem modellierten Organismus exportiert wird, besteht nahezu vollständig aus CO₂. In beiden Modellen werden ansonsten nur geringste Mengen (< 0,004%) zweier

noch unbenannter Verbindungen (im Modell: UNKNOWN-01, UNKNOWN-02), Kohlenstoffmonoxid und S-Adenosyl-4-methylthio-2-oxobutanoat gebildet und anschließend exportiert.

Der Zentralstoffwechsel von *T. thermophilus* HB27 umfasst die Glykolyse, den Citratzyklus, die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA, die oxidative Phosphorylierung und den nicht-oxidativen Teil des Pentosephosphatweges (PPP) [73]. Ein oxidierender PPP ist nicht vorhanden. Die Flüsse durch den Zentralstoffwechsel entsprechen durch die aktualisierte Biomassezusammensetzung (Tabelle 3) und den höheren Biomassefluss (Tabelle 6) nicht mehr den Flüssen im Ausgangsmodell. Daher und um einen Vergleich mit dem modellierten Wachstum auf anderen Kohlenstoffquellen zu erleichtern, werden im Folgenden die Kohlenstoffflüsse durch den Zentralstoffwechsel näher betrachtet (Abbildung 16 und 17). Zudem wurden seit der letzten Charakterisierung des Modells ^{13}C -Fluss-Analysen des Kohlenstoffs für den Zentralstoffwechsel des nahe verwandten Stammes *T. thermophilus* HB8 durchgeführt, sodass das Modell gegenüber diesen Daten validiert werden kann.

Nach der Aufnahme über einen aktiven ABC-Transporter wird mit etwa 88 % der Großteil des Kohlenstoffs über die Glykolyse zu Phosphoenolpyruvat abgebaut (Abbildung 16). Dieser Wert liegt nahe an dem Wert von 81 %, welcher über ^{13}C -Analysen für *T. thermophilus* HB8 ermittelt wurde. Die Kohlenstoffflüsse durch die Metaboliten Fructose-1,6-bisphosphat und D-Glyceraldehyd-3-phosphat entsprechen mit 93 % bzw. 94 % ebenfalls sehr gut den experimentell ermittelten Flüssen (93 % bzw. 91 %). Etwa 2,5 % des Kohlenstoffs werden in Form von D-Fructose-6-phosphat für die Synthese von Glykogen und die Zellwand-Biosynthese abgezweigt aus der Glykolyse abgezweigt. Weitere 4,5 % des Kohlenstoffs werden in Form von D-Fructose-6-phosphat und D-Glyceraldehyd-3-phosphat zudem im PPP für die spätere Synthese von Nukleotiden und aromatischen Aminosäuren benötigt. Auf Ebene des 3-Phospho-D-Glycerats werden weitere 3 % des Kohlenstoffs für die Serin-Biosynthese abgezweigt. Ausgehend von dem in der Glykolyse gebildetem Phosphoenolpyruvat (Abbildung 17) wird mit 76,5 % der

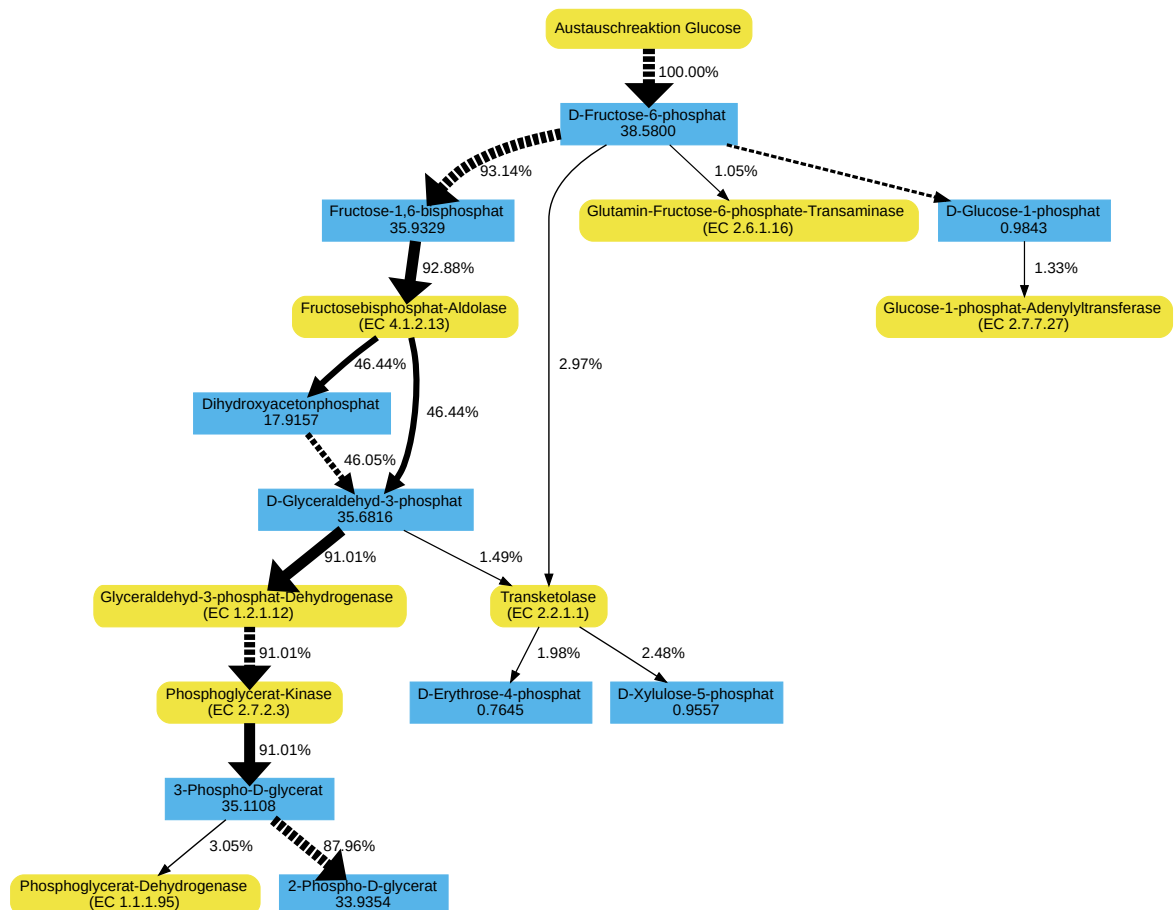


Abbildung 16: Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse an den metabolischen Verzweigungspunkten D-Fructose-6-phosphat, D-Glyceraldehyd-3-phosphat und 3-Phospho-D-Glycerat im Modell von *T. thermophilus* HB27 für das Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Kohlenstoffflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in $\text{mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Kohlenstoffflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Kohlenstoff, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 1 % werden nicht angezeigt.

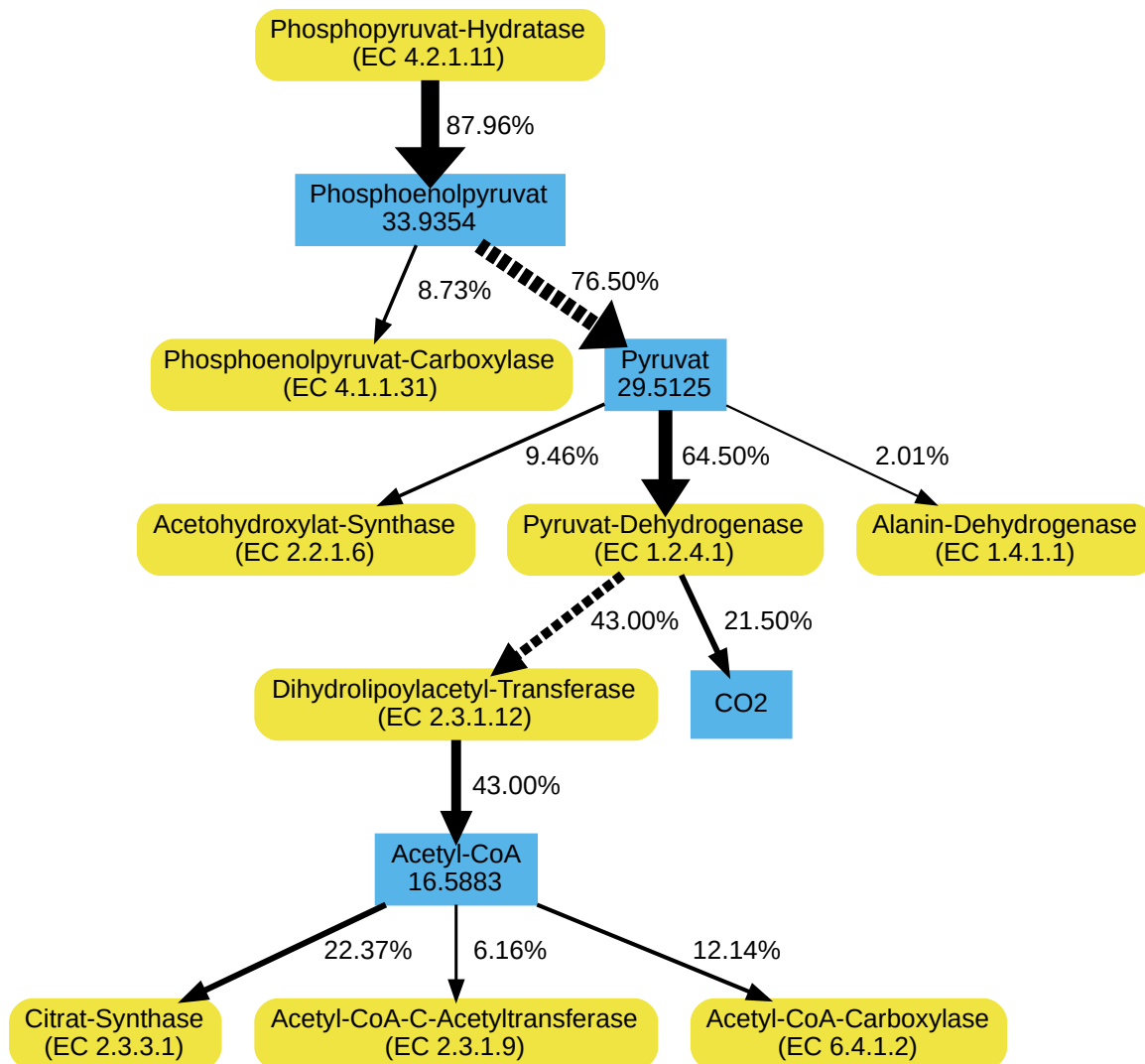


Abbildung 17: Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse an den metabolischen Verzweigungspunkten Pyruvat und Acetyl-CoA im Modell von *T. thermophilus* HB27 für das Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Kohlenstoffflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in $\text{mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Kohlenstoffflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Kohlenstoff, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 2 % werden nicht angezeigt.

Großteil des Kohlenstoffs weiter für die Bildung von Pyruvat und anschließend die oxidative Decarboxylierung verwendet. Das hierüber produzierte Acetyl-CoA macht circa 43% des gesamten Kohlenstoffs aus. Etwa 22,3 % dieses Kohlenstoffes werden in den Citratzyklus geschleust und dort zum Großteil, etwa 20,6 % des Kohlenstoffs, zu CO₂ abgebaut. Andere Kohlenstoffanteile des Acetyl-CoA werden für die Biosynthese von Fettsäuren (12 %) und Polyhydroxyalkanoaten (6 %) benötigt. Da jedoch nicht sämtliches Phosphoenolpyruvat zu Acetyl-CoA umgesetzt wird, sondern auch ein Teil in der Reaktion der PEP-Carboxylase (EC 4.1.1.31) für die Fixierung von Kohlenstoff eingesetzt wird, werden weitere 11,6 % Kohlenstoff in Form des dabei produzierten Oxalacetat in den Citratzyklus geleitet. Stellt man die Anteile an Kohlenstoff, die über Acetyl-CoA und Oxalacetat in den Citratzyklus eingeführt werden, der Produktion von CO₂ im Citratzyklus gegenüber, verbleiben 13,3 % des aufgenommenen Kohlenstoffes, welcher letztlich ausgehend vom Citratzyklus für anabole Stoffwechselwege wie Aminosäuresynthesen verwendet wird. Etwa 43 % des Kohlenstoffs werden in Form von Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingebracht, was nahe dem experimentellen Wert von 41 % liegt. Im Vergleich zum Ausgangsmodell bestehen deutliche Unterschiede im Kohlenstoff- und Energiestoffwechsel beim modellierten Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle. Auf Grundlage des aktuellen Modells ist ersichtlich, dass der relative Fluss an Kohlenstoff durch die Glykolyse deutlich höher ist als bisher vermutet, was wiederum Auswirkungen auf den Energiestoffwechsel hat (siehe unten). Die mit Hilfe dieses Modells vorhergesagten Biomasseflüsse konnten durch den Vergleich mit experimentellen Wachstumsraten bestätigt werden. Ebenso konnte das Modell durch den Vergleich der vorhergesagten Kohlenstoffflüsse mit ¹³C-Analysen ohne jegliche Anpassungen der internen Flüsse (wie erzwungenen Aufspaltungsverhältnissen von Metaboliten des Zentralstoffwechsels) für das modellierte Wachstum auf Glucose validiert werden. Es ist davon auszugehen, dass die vom Modell vorhergesagten Kohlenstoffflüsse demnach auch für andere Kohlenstoffquellen eine hohe Konfidenz aufweisen.

Energiestoffwechsel

Der Vergleich von Split-ratio Analysen (Kapitel 2.2.6) der Metabolite ATP, NADH, und NADPH erlaubt es, die wesentlichen Unterschiede im Energiestoffwechsel zwischen dem aktuellen Modellstand und dem Ausgangsmodell auszumachen (Tabelle 7). Die Metabolit produzierenden und verbrauchenden Flüsse in der Glykolyse, der oxidativen Decarboxylierung, dem Citratzyklus und der Atmungskette unterscheiden sich durch die am Modell vorgenommen Änderungen deutlich. Im Gegensatz zum Ausgangsmodell wurden die Flüsse durch die Glykolyse bisher unterschätzt. Dieser Stoffwechselweg produziert im aktuellen Modell den Großteil des NADH für die oxidative Phosphorylierung sowie – netto – 16 % des ATP (38 % werden in der Glykolyse produziert und 22 % wieder verbraucht). Die NADH und ATP produzierenden Anteile der oxidativen Decarboxylierung und des Citratzyklus wurden hingegen bisher geringfügig überschätzt. Aus der Bilanzierung der NADPH produzierenden und verbrauchenden Reaktionen ist weiterhin ersichtlich, dass im aktuellen Modell nun auch etwa ein Drittel des NADPH über die NAD(P)H-Transhydrogenase (EC 1.6.1.2) unter NADH-Verbrauch regeneriert wird, was eher der physiologischen Funktion dieses Enzyms [132,133] entspricht. Der größte Anteil des NADPH wird, wie bereits vom Ausgangsmodell vorhergesagt, über die in *T. thermophilus* NADP⁺-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) [150] produziert. Das temperaturabhängige Protonenleck in der Atmungskette von *T. thermophilus* HB27 ist sowohl Bestandteil des Ausgangsmodells als auch des aktuellen Modells. Klassischerweise würde der Energieverlust aus dieser Reaktion über die NGAM abgedeckt, also in die wachstumsunabhängigen Energiekosten mit einberechnet [15]. Durch den explizit modellierten Leckfluss lässt sich allerdings der Anteil dieser Reaktion an den wachstumsunabhängigen Energiekosten konkret abschätzen. Im Ausgangsmodell beträgt der Verlust an ATP-Äquivalenten $28,0 \text{ mmol ATP} \cdot g_{\text{BTM}}^{-1} \cdot h^{-1}$ durch das Protonenleck und weitere $19,0 \text{ mmol ATP} \cdot g_{\text{BTM}}^{-1} \cdot h^{-1}$ durch die separate NGAM-Reaktion, welche alle anderen wachstumsunabhängigen Energiekosten repräsentiert. Im aktuellen Modell verändern sich diese Werte auf $32,1 \text{ mmol ATP} \cdot g_{\text{BTM}}^{-1} \cdot h^{-1}$ für das

Tabelle 7: Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle für das Ausgangsmodell und den aktuellen Modellstand.

Die Gesamtflüsse der jeweiligen Metabolite betragen 56,1865 (ATP), 28,6041 (NADH) und 6.8915 (NADPH) $\text{mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Aufgelistet sind die relativen Anteile spezifischer Metabolit produzierender und verbrauchender Reaktionen. Relative Flüsse kleiner als 3,5 % sind nur aufgelistet wenn sie im jeweils anderen Szenario einen höheren Fluss aufweisen.

Reaktion / Enzym	EC-Nummer	Stoffwechselweg	Anteil in	
			Stark (2013)	Diese Arbeit
ATP – produzierend				
ATP-Synthase	3.6.3.14	Atmungskette	67,1%	55,5%
Phosphoglycerat-Kinase	2.7.2.3	Glykolyse	13,7%	20,7%
Pyruvat-Kinase	2.7.1.40	Glykolyse	11,2%	17,4%
Succinat-CoA-Ligase	6.2.1.5	Citratzyklus	8,0%	6,4%
ATP – verbrauchend				
GAM	-	Energiehaushalt	20,5%	46,5%
Glucokinase	2.7.1.2	Glykolyse	7,7%	11,4%
ABC-Transporter Glucose	-	Transport	7,7%	11,4%
6-Phosphofructokinase	2.7.1.11	Glykolyse	7,0%	10,6%
NGAM	-	Energiehaushalt	46,2%	7,4%
Acetyl-CoA-Carboxylase	6.4.1.2	Fettsäure-Synthese	0,5%	4,1%
NADH – produzierend				
Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	1.2.1.12	Glykolyse	27,8%	40,6%
Dihydrolipoyl-Dehydrogenase	1.8.1.4	Oxidative Decarboxylierung	36,6%	29,2%
Malate-Dehydrogenase	1.1.1.37	Citratzyklus	17,9%	13,7%
Oxoglutarat-Dehydrogenase	1.2.4.2	Citratzyklus	16,5%	12,6%
NADH – verbrauchend				
NADH-Dehydrogenase	1.6.5.3	Atmungskette	89,6%	78,7%
NAD(P)H-Transhydrogenase	1.6.1.2	Atmungskette	0,0%	8,3%
NADPH – produzierend				
Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.42	Citratzyklus	91,9%	62,3%
NAD(P)H-Transhydrogenase	1.6.1.2	Atmungskette	0,0%	34,4%
NADPH – verbrauchend				
Glutamat-Dehydrogenase (NADPH)	1.4.1.3	Aminosäuren	0,0%	41,8%
Ketolat-Reduktoisomerase	1.1.1.86	Aminosäuren	6,5%	8,8%
3-Oxoacyl-[ACP]-Reduktase (3x)	1.1.1.100	Fettsäure-Synthese	3,7%	21,8%
Iso-C11-Fettsäure-Synthese	-	Fettsäure-Synthese	0,8%	4,9%
Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	1.2.1.11	Aminosäuren	1,8%	3,5%

Protonenleck und $4,2 \text{ mmol ATP} \cdot g_{\text{BTM}}^{-1} \cdot h^{-1}$ für die NGAM-Reaktion. Es ist möglich, den Verlust an Protonen mit der separaten NGAM-Reaktion zu verrechnen, um den Wert einer „klassischen“ NGAM zu ermitteln. Im aktuellen Modell hat das Protonenleck einen sehr hohen Anteil von 88 % an der kombinierten NGAM von $36,3 \text{ mmol ATP} \cdot g_{\text{BTM}}^{-1} \cdot h^{-1}$ (gegenüber 60 % von $47,0 \text{ mmol ATP} \cdot g_{\text{BTM}}^{-1} \cdot h^{-1}$ im Ausgangsmodell). Dieser deutliche Anstieg des Protonenlecks am Anteil der kombinierten NGAM ist auf die deutlich erhöhte Atmungsrate im Modell zurückzuführen, welche sich letztendlich durch die höhere Glucoseaufnahmerate bei gleichbleibender Kohlenstoffbilanz ergibt – sprich, der Anteil des über die Atmung freigesetzten CO_2 wurde bisher unterschätzt. Die Atmungsrate im Modell lässt sich über die Anzahl der translozierten Protonen (aktuell 151 gegenüber ehemals 128 $\text{mmol H}^+ \cdot g_{\text{BTM}}^{-1} \cdot h^{-1}$) sowie die Sauerstoffaufnahmerate (aktuell 13,2 gegenüber ehemals $10,8 \text{ mmol O}_2 \cdot g_{\text{BTM}}^{-1} \cdot h^{-1}$) vergleichen. Sie ist im aktuellen Modell daher etwa 20 % höher als im Ausgangsmodell, allerdings liegen beide Werte noch in dem Bereich von $10 - 15 \text{ mmol O}_2 \cdot g_{\text{BTM}}^{-1} \cdot h^{-1}$, welcher für optimales Wachstum von *T. thermophilus* beschrieben wurde [151]. Die Effizienz der Atmung scheint für *T. thermophilus* HB27 letztlich einen extrem großen Einfluss auszuüben. Zudem muss ein großer Teil der chemischen Energie im metabolischen Netzwerk für die Aufrechterhaltung des Protonengradienten aufgewendet werden, da dieser durch das Protonenleck maßgeblich beeinträchtigt wird.

Essentielle Metabolitflüsse und Variabilität im Modell

Mittels der mathematische Methoden MFM und FVA können diejenigen Metabolite und Reaktionen identifiziert werden, die in einem spezifischen Szenario essentiell für einen maximalen Biomassefluss sind (Kapitel 2.2.2 und 2.2.7). Von den insgesamt 1061 Metaboliten werden mittels optimaler MFM 505 Metaboliten essentiell für das modellierte Wachstum auf Glucose vorhergesagt (gegenüber 508 im Ausgangsmodell). Mittels suboptimaler MFM werden stattdessen von den 505 eben genannten Metaboliten nur noch 503 Metabolite als essentiell eingestuft (ehemals 498). Als nicht mehr essentiell gelten bei der suboptimalen MFM die Metabolite 1,3-Bisphospho-D-glycerat und 3-Phospho-D-glycerat. Diese

Metabolite sind zentrale Intermediate der Glykolyse und es ist daher verwunderlich, dass sie im Modell als nicht-essentiell für einen nahezu optimalen Biomassefluss (95 % des Maximums) gelten. Deaktiviert man im Modell Reaktionen der Glykolyse, an denen diese Metabolite beteiligt sind, so wird dennoch ein Biomassefluss (Wachstum) vorhergesagt. In einem solchen Szenario werden Reaktionen aktiv, die klassischerweise aus dem Entner-Doudoroff-Weg [152–155] bekannt sind. Die vier ersten Enzyme dieses Stoffwechselweges sind für *T. thermophilus* annotiert und im Falle der 2-Keto-3-deoxygluconat-Kinase sogar beschrieben [156]. Diese Reaktionen sind höchstwahrscheinlich relevant für das Wachstum des Organismus auf D-Gluconat als alleiniger Kohlenstoffquelle [79]. Für das Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle konnte für *T. thermophilus* HB8 allerdings keine Aktivität dieser Reaktionen nachgewiesen werden [100]. Es ist daher unwahrscheinlich, dass *in vivo* ein relevanter Anteil an Glucose über diese Reaktionen abgebaut wird. Die Metabolite 1,3-Bisphospho-D-glycerat und 3-Phospho-D-glycerat sind damit weiterhin essentiell für einen optimalen Biomassefluss beim modellierten Wachstum auf Glucose. Von den 513 aktiven Reaktionen im aktuellen Stand des Modells sind laut optimaler FVA 495 essentiell, da sie niemals einen Fluss von null annehmen können (503 bzw. 485 Reaktionen im Ausgangsmodell). Bei den 18 nicht-essentiellen Reaktionen handelt es sich um dieselben nicht-essentiellen Reaktionen wie im Ausgangsmodell. Von den 680 inaktiven Reaktionen im Modell können laut optimaler FVA 18 Reaktionen einen größeren Fluss als $10^{-7} \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ annehmen und somit aktiv werden (ehemals 17 von 675). Die Definiertheit des Modells, bzw. die Variabilität im Modell, hat sich daher nicht deutlich verändert.

3.2.2.2 Glycerol

Wachstumsrate

Die vom Modell vorhergesagte Wachstumsrate für das Wachstum auf Glycerol als alleiniger Kohlenstoffquelle beträgt $0,24 \text{ h}^{-1}$ und liegt damit unter der experimentell bestimmten Wachstumsrate von $0,34 \text{ h}^{-1}$. Die vom Modell erreichbare Wachstumsrate wird durch den Kohlenstoffgehalt der modellierten Biomasse, die

Substrataufnahmerate und die Kohlenstoffbilanz nach oben begrenzt. Da die Wachstumsrate, Substrataufnahmerate und Kohlenstoffbilanz experimentell ermittelt wurden, liegt der Schluss nahe, dass sich beim Wachstum auf Glycerol die Biomassezusammensetzung von jener beim Wachstum auf Glucose unterscheidet. Es ist denkbar, dass durch die Anwesenheit von intrazellulärem Glycerol bestimmte kompatible Solute, wie z.B. Mannosylglycerat, nicht mehr produziert werden, da Glycerol selbst bereits ein kompatibles Solut ist und gegen osmotischen Stress schützt [157–159]. Glycerol kann weiterhin auch stabilisierend auf Lipidmembranen unter dehydrierenden Bedingungen wirken (niedrige Temperaturen, geringe Luftfeuchte, osmotischer Stress), indem es sich in die Membranen einlagert und bei Wasserentzug die Fluidität gewährleistet [160]. Hierbei werden etwa 0 – 10 % der Zelltrockenmasse an Glycerol akkumuliert. Außerdem existieren Studien, in denen extrazelluläres Glycerol die Thermoresistenz von tierischen Zellen erhöhen konnte [161]. All dies sind Faktoren, die beim Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf Glycerol Einfluss auf die Biomassezusammensetzung und auch den Energiehaushalt haben könnten.

Zentralstoffwechsel

Die Kohlenstoffaufnahme beim modellierten Wachstum auf Glycerol ist mit $28,7 \text{ mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ geringer als beim modellierten Wachstum auf Glucose (Vergleich: $38,6 \text{ mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Der Abbau des intrazellulären Glycerol erfolgt in *T. thermophilus* HB27 wie in anderen Bakterien auch über die Phosphorylierung des Glycerol zu Glycerol-3-phosphat und anschließender Oxidation zu Dihydroxyacetonphosphat [162,163]. Im Gegensatz zu anderen Bakterien konnte für den Oxidationsschritt jedoch keine membrangebundene Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.5.3) annotiert werden. Es ist davon auszugehen, dass eine andere vorhandene Dehydrogenase, wie zum Beispiel die NAD^+ -abhängige Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.94), diese Aufgabe übernimmt. Letzteres Enzym katalysiert normalerweise die Synthese von Glycerol-3-phosphat aus Dihydroxyacetonphosphat für die Fettsäurebiosynthese, diese Reaktion ist

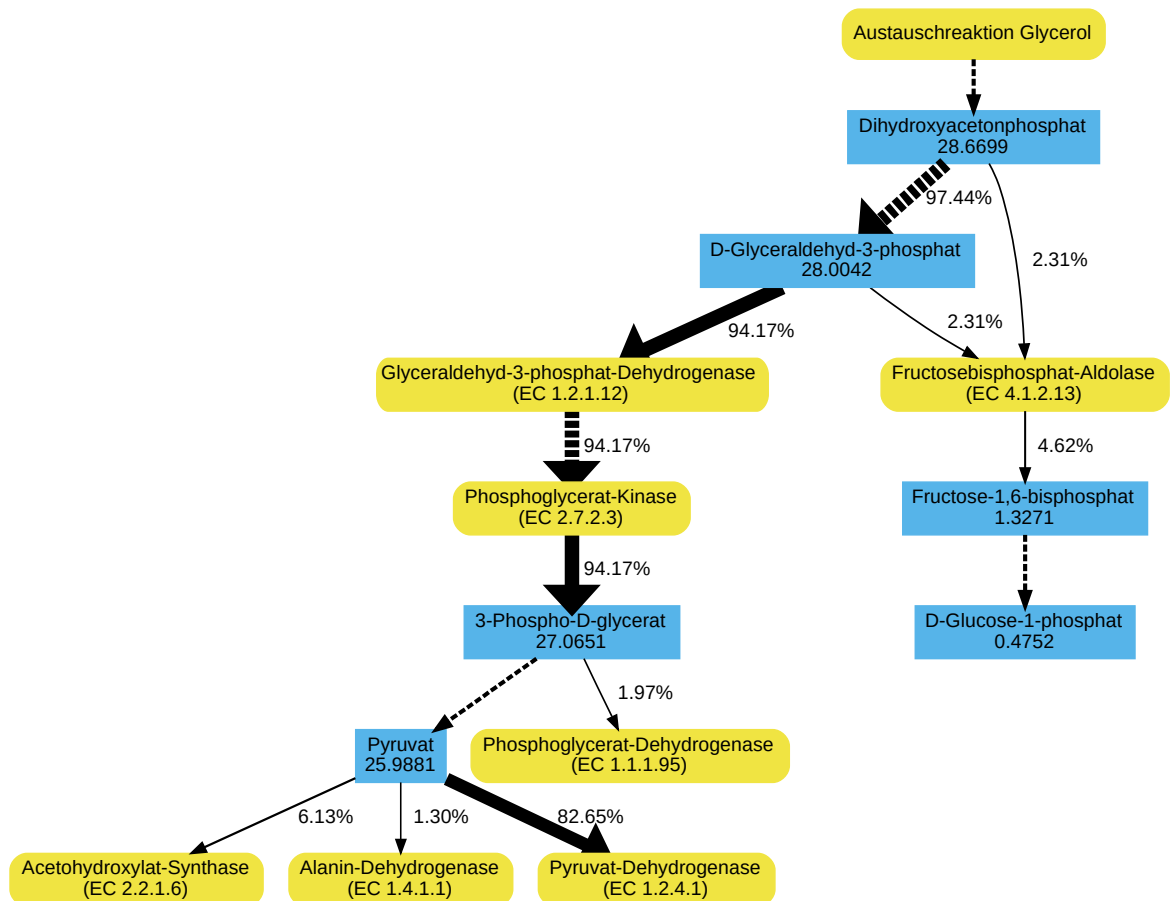


Abbildung 18: Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse an den metabolischen Verzweigungspunkten Dihydroxyacetonephosphat, 3-Phospho-D-glycerat und Pyruvat im Modell von *T. thermophilus* HB27 für das Wachstum auf Glycerol als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Kohlenstoffflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in $\text{mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Kohlenstoffflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Kohlenstoff, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 1 % werden nicht angezeigt.

jedoch auch reversibel [164–166]. Die Verwertung des so produzierten Dihydroxyacetonphosphats im Modell (Abbildung 18) erfolgt wie beim Wachstum auf Glucose hauptsächlich über die Glykolyse, oxidative Decarboxylierung und den Citratzyklus. Etwa 90 % des aufgenommenen Kohlenstoffes werden auf diese Weise in Pyruvat umgesetzt, deutlich mehr also als beim modellierten Wachstum auf Glucose (Vergleich: 77 %). Dementsprechend steht im Glycerol-Szenario weniger des Gesamtkohlenstoffes für bestimmte anabole Stoffwechselwege (Serin-Biosynthese, PPP, Gluconeogenese) zur Verfügung. Nachdem das Pyruvat über die oxidative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA umgewandelt wurde, wird im Glycerol-Szenario ein deutlich größerer Anteil des Kohlenstoffes (38,0 % gegenüber 22,4 % im Glucose-Szenario) in den Citratzyklus eingeschleust. Der Citratzyklus wiederum produziert im Glycerol-Szenario einen erhöhten Anteil an CO₂ (49 % allen produzierten CO₂ gegenüber 39 % im Glucose-Szenario). Auch hier werden anabole Stoffwechselwege also mit einem geringeren Fluss bedient als im Glucose-Szenario.

Energiestoffwechsel

Das kombinierte P/O-Verhältnis im Glycerol-Szenario ist mit einem Wert von 2,57 höher gegenüber dem Glucose-Szenario (Vergleich: 2,38). Dies bedeutet letztlich, dass gegenüber der Referenz (relativ) mehr NADH als Succinat für den Aufbau des Protonengradienten verwendet wird. Dies ist auch aus dem Vergleich von Split-ratio Analysen der Metabolite ATP, NADH und NADPH ersichtlich (Tabelle 8). Der Gesamtfluss an NADH ist im Glycerol-Szenario deutlich höher und es wird nahezu ausschließlich in der Atmungskette verbraucht. Der Großteil der NADH in diesem Szenario stammt aus der Oxidation des aufgenommenen Glycerols, auch wenn weiterhin große Mengen in der Glykolyse, der oxidativen Decarboxylierung und dem Citratzyklus produziert werden (je größer 20 %). Aus den hohen Flüssen durch die Atmungskette resultiert, dass auch der Großteil des ATP in diesem Stoffwechselweg gebildet wird. Die Glykolyse trägt mit einem absolut geringeren Anteil als in der Referenz zur ATP-Produktion bei, was darauf zurückzuführen ist,

Tabelle 8: Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf Glucose und Glycerol als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Die Gesamtflüsse der jeweiligen Metabolite für Glucose bzw. Glycerol betragen 56,1865 / 76,4401 (ATP), 28,6041 / 39,0342 (NADH) und 6,8915 / 4,9959 (NADPH) mmol · g_{BTM}⁻¹ · h⁻¹. Aufgelistet sind die relativen Anteile spezifischer Metabolit produzierender und verbrauchender Reaktionen. Relative Flüsse kleiner als 5 % sind nur aufgelistet wenn sie im jeweils anderen Szenario einen höheren Fluss aufweisen.

Reaktion / Enzym	EC-Nummer	Stoffwechselweg	Anteil in Szenario	
			Glucose	Glycerol
ATP – produzierend				
ATP-Synthase	3.6.3.14	Atmungskette	55,5%	71,1%
Phosphoglycerat-Kinase	2.7.2.3	Glykolyse	20,7%	11,7%
Pyruvat-Kinase	2.7.1.40	Glykolyse	17,4%	11,3%
Succinat-CoA-Ligase	6.2.1.5	Citratzyklus	6,4%	5,9%
ATP – verbrauchend				
GAM	-	Energiehaushalt	46,5%	16,5%
Glucokinase	2.7.1.2	Glykolyse	11,4%	0,0%
ABC-Transporter (Substrat)	-	Transport	11,4%	12,4%
6-Phosphofructokinase	2.7.1.11	Glykolyse	10,6%	0,0%
NGAM	-	Energiehaushalt	7,4%	54,0%
Glycerol-Kinase	2.7.1.30	Glycerol-Abbau	0,0%	12,4%
NADH – produzierend				
Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	1.2.1.12	Glykolyse	40,6%	23,0%
Dihydrolipoyl-Dehydrogenase	1.8.1.4	Oxidative Decarboxylierung	29,2%	20,4%
Malate-Dehydrogenase	1.1.1.37	Citratzyklus	13,7%	14,8%
Oxoglutarat-Dehydrogenase	1.2.4.2	Citratzyklus	12,6%	11,7%
Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase	1.1.1.94	Fettsäure-Synthese	0,0%	24,4%
NADH – verbrauchend				
NADH-Dehydrogenase	1.6.5.3	Atmungskette	78,7%	95,4%
NAD(P)H-Transhydrogenase	1.6.1.2	Atmungskette	8,3%	0,0%
NADPH – produzierend				
Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.42	Citratzyklus	62,3%	97,8%
NAD(P)H-Transhydrogenase	1.6.1.2	Atmungskette	34,4%	0,0%
NADPH – verbrauchend				
Glutamat-Dehydrogenase (NADPH)	1.4.1.3	Aminosäuren	41,8%	61,3%
3-Oxoacyl-[ACP]-Reduktase (3x)	1.1.1.100	Fettsäure-Synthese	21,8%	14,6%
Ketolat-Reduktoisomerase	1.1.1.86	Aminosäuren	8,8%	5,8%

dass nur ein Teil der Glykolyse aktiv ist. Der ATP-Verbrauch im Modell wird weiterhin durch GAM und NGAM dominiert (zusammen 60 % des ATP-Verbrauchs gegenüber 45 % in der Referenz), allerdings ist der Fluss durch die NGAM im Glycerol-Szenario deutlich höher. Dies ist auf die Erhöhung der NGAM im Rahmen der Anpassung des Modells an die experimentell ermittelte Kohlenstoffbilanz zurückzuführen. Durch die hohen Flüsse in der Atmungskette steigt der vorhergesagte Sauerstoffverbrauch sehr stark an, etwa 21,3 gegenüber 13,2 $\text{mmol O}_2 \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ in der Referenz. Diese Sauerstoffaufnahme ist sehr hoch, insbesondere wenn man sie mit der vergleichsweise niedrigen Wachstumsrate zusammen betrachtet [151]. Da die Löslichkeit von Sauerstoff bei hohen Temperaturen vergleichsweise gering ist (bei 70 °C nur etwa 60 % des gelösten Sauerstoff im Vergleich zu 20 °C) [167,168] und der Sauerstoffbedarf des Organismus für das Wachstum auf Glucose bereits als sehr hoch eingestuft wird [151], könnte das Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf Glycerol daher durchaus sauerstofflimitiert sein.

Signifikante Änderungen gegenüber der Referenz

Laut suboptimaler MFM sind im Glycerol-Szenario nur die Metabolite Fructose-1,6-bisphosphat, Glycerol-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat signifikant verändert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Glycerol-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat Intermediate des Abbaufweges von Glycerol sind, während Fructose-1,6-bisphosphat ein Produkt der Gluconeogenese ist. Letzterer Stoffwechselweg wird auf diesem Substrat benötigt, da auf anderem Wege keine Hexosen für anabole Stoffwechselwege bereitgestellt werden können (Biosynthese von Zellwandmonomeren, Glykolipiden und Nukleotiden). Abgesehen von den Reaktionen, die direkt am Transport und der Phosphorylierung von Glucose oder Glycerol beteiligt sind, sind im Glycerol-Szenario laut suboptimaler FVA die Flüsse durch folgende Reaktionen bzw. Enzyme signifikant erhöht (Abbildung 19):

- Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.94)
- Triosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.1)

- Alle Reaktionen der Atmungskette inklusive des Protonenlecks aber mit Ausnahme der NAD(P)H-Transhydrogenase (EC 1.6.1.2)
- Die Austausch- und Transportreaktionen für H^+ , H_2O und O_2 .

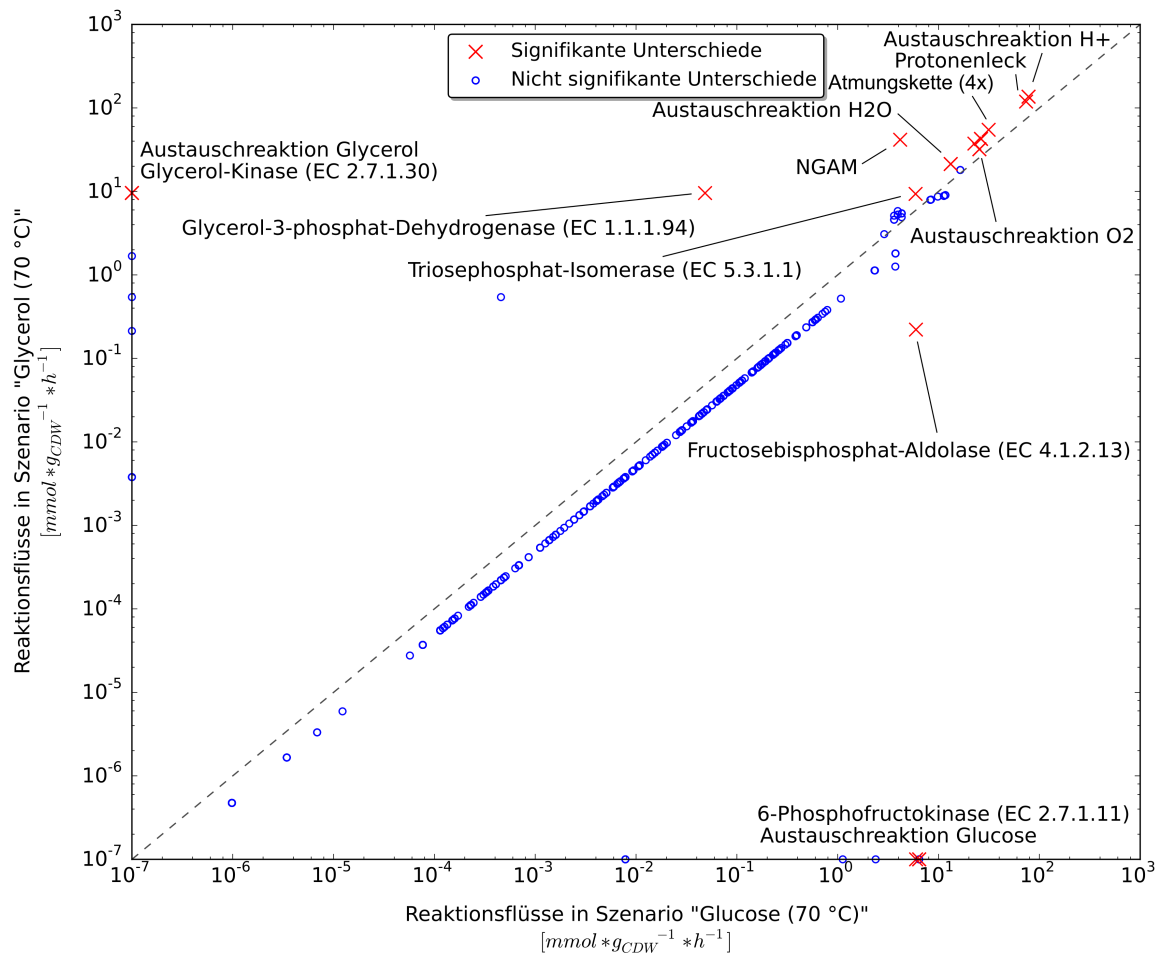


Abbildung 19: Vergleich der mittels suboptimaler FVA ermittelten signifikant veränderten Reaktionsflüsse beim modellierten Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf den alleinigen Kohlenstoffquellen Glucose und Glycerol.

Reaktionen desselben Stoffwechselweges wurden teilweise zusammengefasst (die Anzahl der Reaktionen ist dann in Klammern angegeben). Transportreaktionen werden nicht angezeigt, da sie bereits durch Austauschreaktionen repräsentiert sind.

Die beiden Enzyme Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase und Triosephosphat-Isomerase sind am Abbau des Glycerols beteiligt und müssen daher im Modell einen hohen Fluss aufweisen. Die hohe Atmungsrate hingegen ist durch den erhöhten Energiebedarf (NGAM) sowie den Abbau des Glycerols über den

Citratzyklus bedingt. Einen im Glycerol-Szenario signifikant niedrigeren Fluss weist die Reaktion der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (EC 4.1.2.13) auf. Diese Reaktion ist in beiden Szenarien aktiv, ändert beim modellierten Wachstum auf Glycerol jedoch die Reaktionsrichtung. In diesem Szenario wird die Reaktion nicht für Abbau von Glucose (Glykolyse), sondern für die Synthese von Hexosen (Gluconeogenese) benötigt. Das metabolische Netzwerk von *T. thermophilus* HB27 wird auf Glycerol als alleiniger Kohlenstoffquelle letztlich also über die sehr hohen Flüsse durch den Citratzyklus, die Atmungskette und Gluconeogenese bestimmt.

3.2.2.3 Succinat

Wachstumsrate

Die vom Modell vorhergesagte Wachstumsrate für das Wachstum auf Succinat als alleiniger Kohlenstoffquelle beträgt $0,43 \text{ h}^{-1}$ und liegt damit sehr nahe an der experimentell bestimmten Wachstumsrate von $0,46 \text{ h}^{-1}$. Die im Folgenden untersuchten Flüsse innerhalb des Modells sollten demnach eine hohe Konfidenz aufweisen.

Zentralstoffwechsel

Die Kohlenstoffaufnahmebeim modellierten Wachstum auf Succinat ist mit $77,8 \text{ mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ etwa doppelt so hoch wie beim modellierten Wachstum auf Glucose (Vergleich: $38,6 \text{ mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Das Succinat wird nach dem Transport in die Zelle direkt in den Citratzyklus eingeschleust (Abbildung 26). Dieser wiederum bedient zentral alle anderen Stoffwechselwege und wird selbst auch als kataboler Stoffwechselweg verwendet. Der meiste Kohlenstoff im Modell wird dabei ausgehend vom Citratzyklus wie folgt verteilt:

- 51,2 % des Kohlenstoffs werden für die kataplerotische Reaktion der Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.38) aus dem Citratzyklus abgeführt. Über diese Reaktion und die angeschlossene oxidative Decarboxylierung wird jedoch viel dieses Kohlenstoffs zu CO_2 abgebaut (37,9 %). Der verbleibende

Kohlenstoff wird für die Fettsäure-Biosynthese (7,5 %) und die Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren (5,8 %) sowie Alanin (1,0 %) verwendet.

- 21,6 % des Kohlenstoffs werden im Citratzyklus für die Reduzierung von Reduktionsäquivalenten und Menachinon zu CO₂ abgebaut.
- 12,1 % des Kohlenstoffs werden über die kataplerotische Reaktion der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (EC 4.1.1.49) den anabolen Stoffwechselwegen Gluconeogenese und PPP sowie einigen Aminosäuresynthesen zugeführt. Dabei werden 3,0 % des Gesamtkohlenstoffs zu CO₂ abgebaut.
- 7,4 % des Kohlenstoffs werden als Acetyl-CoA aus dem Citratzyklus für die Fettsäure-Biosynthese abgeführt.
- 4,9 % des Kohlenstoffs werden netto für die Synthese von Glutamat, Glutamin und Nukleotiden als 2-Oxoglutarat aus dem Citratzyklus abgezweigt. Es verlässt zwar ein größerer Anteil des Kohlenstoffs den Citratzyklus als 2-Oxoglutarat (26,5 %), dieses wird jedoch als Produkt diverser Transaminierungsreaktionen wieder in den Citratzyklus zurückgeführt (21,6 %).

Der Großteil des CO₂ in diesem Szenario wird interessanterweise nicht durch den – teilweise äußerst aktiven – Citratzyklus, sondern über die kataplerotischen Reaktionen der Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.38) und Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (EC 4.1.1.49) produziert. Die relativen Anteile an CO₂, die durch die oxidative Decarboxylierung und den Citratzyklus gebildet werden, sind sogar etwas geringer gegenüber der Referenz. Da der Eintrittspunkt für sämtlichen Kohlenstoff in den Citratzyklus Succinat ist, können die CO₂ produzierenden Reaktionen des Citratzyklus in einem gewissen Ausmaß umgangen werden, die kataplerotischen Reaktionen jedoch nicht.

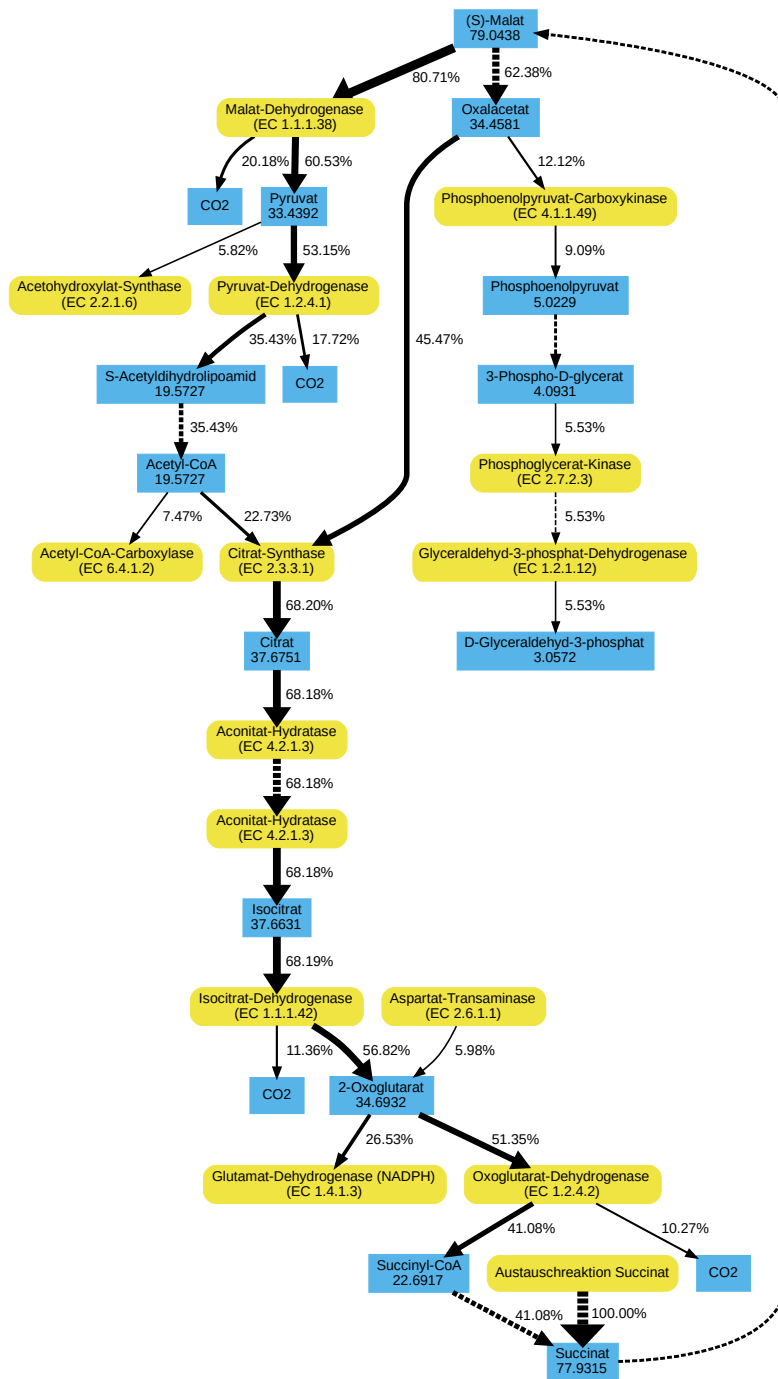


Abbildung 20: Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse im Modell von *T. thermophilus* HB27 für das Wachstum auf Succinat als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Kohlenstoffflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in mmol C · g_{BTM}⁻¹ · h⁻¹ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Kohlenstoffflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Kohlenstoff, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 5 % werden nicht angezeigt.

Energiestoffwechsel

Das kombinierte P/O-Verhältnis ist im Succinat-Szenario mit einem Wert von 2,13 etwas niedriger gegenüber dem Glucose-Szenario (Vergleich: 2,38). Dies weist darauf hin, dass gegenüber der Referenz (relativ) mehr Succinat bzw. weniger NADH für den Aufbau des Protonengradienten verwendet wird. Der vorhergesagte Sauerstoffverbrauch liegt bei 26,0 gegenüber 13,2 mmol O₂ · g_{BTM}⁻¹ · h⁻¹ in der Referenz und ist damit äußerst hoch [151]. Das Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf Succinat könnte daher wie das Wachstum auf Glycerol sauerstofflimitiert sein (Kapitel 3.2.2.2). Vergleicht man die Split-ratio Analysen der Metabolite ATP, NADH und NADPH im Succinat-Szenario und der Referenz (Tabelle 9), so lassen sich weitere Merkmale des Energiestoffwechsels bestimmen. Im Succinat-Szenario wird ATP nahezu ausschließlich, im Gegensatz zum modellierten Wachstum auf Glucose oder Glycerol, über die oxidative Phosphorylierung produziert. Nur etwa weitere 9 % des ATP werden im Citratzyklus gebildet. Die Glykolyse ist in diesem Szenario nicht aktiv und trägt nicht zur ATP-Produktion bei. Benötigt wird ATP mit 62 % zum Großteil für den Energiehaushalt (GAM und NGAM) und die Aufnahme des Succinats (23 %). Das hauptsächlich (zu 88 %) für die oxidative Phosphorylierung benötigte NADH wird im Succinat-Szenario zum Großteil durch die kataplerotische Reaktion der Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.38) gebildet. Im Vergleich zur Referenz kann kein NADH über die Glykolyse produziert werden, jedoch ist der Anteil des Citratzyklus an der NADH-Produktion größer (39 % gegenüber 26 %). Die NAD(P)H-Transhydrogenase (EC 1.6.1.2) ist inaktiv, sodass kein NADH für die Regeneration von NADPH verbraucht wird. Dieses wird stattdessen zu 97 % im Citratzyklus über die NADP+-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) produziert. Die Anteile der NADPH-verbrauchenden Reaktionen sind vergleichbar mit der Referenz. Der Energiestoffwechsel beim modellierten Wachstum auf Succinat wird damit maßgeblich durch die hohen Flüsse des Citratzyklus, der Atmungskette und der Malat-Dehydrogenase bestimmt.

Tabelle 9: Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf Glucose und Succinat als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Die Gesamtflüsse der jeweiligen Metabolite für Glucose bzw. Succinat betragen 56,1865 / 60,2235 (ATP), 28,6041 / 36,5572 (NADH) und 6,8915 / 6,45284 (NADPH) mmol · g_{BTM}⁻¹ · h⁻¹. Aufgelistet sind die relativen Anteile spezifischer Metabolit produzierender und verbrauchender Reaktionen.

Reaktion / Enzym	EC-Nummer	Stoffwechselweg	Anteil in Szenario	
			Glucose	Succinat
ATP – produzierend				
ATP-Synthase	3.6.3.14	Atmungskette	55,5%	90,6%
Phosphoglycerat-Kinase	2.7.2.3	Glykolyse	20,7%	0,0%
Pyruvat-Kinase	2.7.1.40	Glykolyse	17,4%	0,0%
Succinat-CoA-Ligase	6.2.1.5	Citratzyklus	6,4%	9,3%
ATP – verbrauchend				
GAM	-	Energiehaushalt	46,5%	38,1%
Glucokinase	2.7.1.2	Glykolyse	11,4%	0,0%
ABC-Transporter (Substrat)	-	Transport	11,4%	22,7%
6-Phosphofructokinase	2.7.1.11	Glykolyse	10,6%	0,0%
NGAM	-	Energiehaushalt	7,4%	24,3%
Acetyl-CoA-Carboxylase	6.4.1.2	Fettsäure-Synthese	4,1%	3,4%
NADH – produzierend				
Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	1.2.1.12	Glykolyse	40,6%	0,0%
Dihydrolipoyl-Dehydrogenase	1.8.1.4	Oxidative Decarboxylierung	29,2%	26,98%
Malate-Dehydrogenase	1.1.1.37	Citratzyklus	13,7%	23,5%
Oxoglutarat-Dehydrogenase	1.2.4.2	Citratzyklus	12,6%	15,5%
Malat-Dehydrogenase	1.1.1.38	Kataplerotische Reaktion	0,0%	30,4%
NADH – verbrauchend				
NADH-Dehydrogenase	1.6.5.3	Atmungskette	78,7%	88,2%
NAD(P)H-Transhydrogenase	1.6.1.2	Atmungskette	8,3%	0,0%
NADPH – produzierend				
Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.42	Citratzyklus	62,3%	96,8%
NAD(P)H-Transhydrogenase	1.6.1.2	Atmungskette	34,4%	0,0%
NADPH – verbrauchend				
Glutamat-Dehydrogenase (NADPH)	1.4.1.3	Aminosäuren	41,8%	45,2%
3-Oxoacyl-[ACP]-Reduktase (3x)	1.1.1.100	Fettsäure-Synthese	21,8%	20,6%
Ketolat-Reduktoisomerase	1.1.1.86	Aminosäuren	8,8%	8,3%
Iso-C11-Fettsäure-Synthese	-	Fettsäure-Synthese	4,9%	4,6%

Signifikante Änderungen gegenüber der Referenz

Laut suboptimaler MFM (Abbildung 21) sind im Succinat-Szenario die minimalen Flüsse von 13 Metaboliten signifikant gegenüber der Referenz verändert. Bei vier davon handelt es sich um die intra- und extrazellulären Repräsentationen der beiden Kohlenstoffquellen Glucose und Succinat. Dass sich die Mindestflüsse dieser Metaboliten signifikant unterscheiden wurde vorausgesetzt. Signifikant erhöhte Mindestflüsse gegenüber der Referenz weisen außerdem die Intermediate der Gluconeogenese Fructose, 3-Phospho-D-glycerat, 2-Phospho-D-glycerat, 1,3-Bisphospho-D-glycerat, Dihydroxyacetonphosphat und Fructose-1,6-bisphosphat auf. Ebenfalls erhöht sind die Mindestflüsse der Citratzyklus-Intermediate Fumarat und Malat. Diese beiden Intermediate folgen im Citratzyklus direkt auf Succinat. Erst Malat stellt im Citratzyklus den ersten möglichen Verzweigungspunkt dar. Die Flüsse durch die beiden Metabolite sind daher an den Succinat-Fluss gekoppelt. Der Metabolit D-Glyceraldehyd-3-phosphat weist gegenüber der Referenz einen signifikant niedrigeren Mindestfluss auf. Er ist in beiden Szenarien aktiv, da er Teil der Glykolyse und Gluconeogenese ist. Der Fluss durch diesen Metaboliten ist im Rahmen der Gluconeogenese, wie sie im Succinat-Szenario benötigt wird, jedoch stets geringer als der Fluss im Glucose-Szenario, in dem der Großteil des Kohlenstoffs durch diesen Metaboliten fließt. Abgesehen von den Reaktionen die direkt am Transport von Glucose oder Succinat beteiligt sind, sind im Succinat-Szenario laut suboptimaler FVA die Flüsse durch folgende Reaktionen bzw. Enzyme signifikant verändert:

- Die Reaktionen von sechs Enzymen der Glykolyse (EC 5.3.1.1, EC 4.1.2.13, EC 1.2.1.12, EC 5.4.2.1, EC 4.2.1.11, EC 2.7.2.3) weisen im Succinat-Szenario signifikant niedrigere Flüsse auf.
- Alle Reaktionen der Atmungskette inklusive des Protonenlecks, aber mit Ausnahme der NAD(P)H-Transhydrogenase (EC 1.6.1.2), sind im Succinat-Szenario signifikant erhöht.

- Die Flüsse durch die Reaktionen der Succinat-Dehydrogenase (EC 1.3.5.1) und Fumarat-Hydratase (EC 4.2.1.2) im Citratzyklus sind im Succinat-Szenario signifikant erhöht.
- Die Austausch- und Transportreaktionen für O_2 und CO_2 sind im Succinat-Szenario signifikant erhöht.

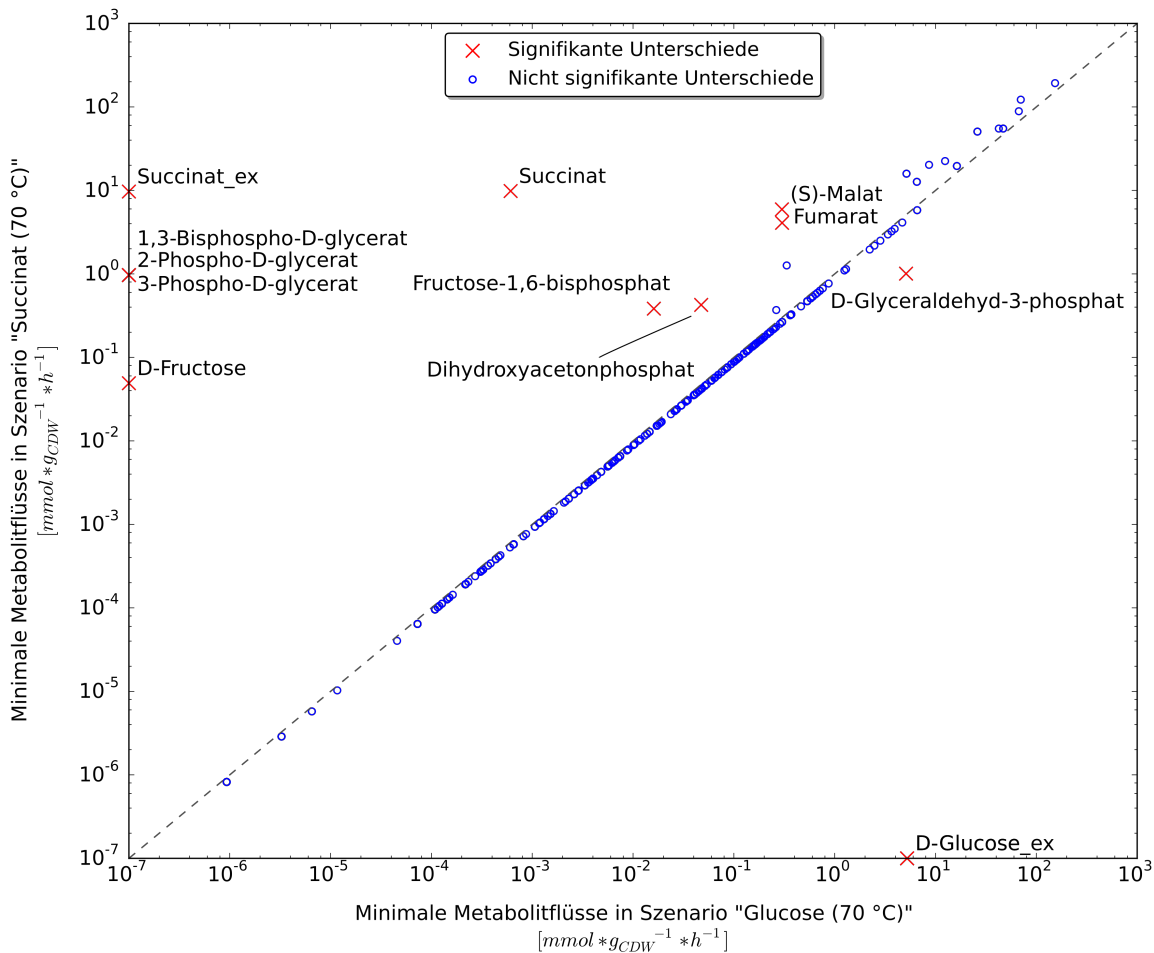


Abbildung 21: Vergleich der mittels suboptimaler MFM ermittelten signifikant veränderten Metabolitflüsse beim modellierten Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf den alleinigen Kohlenstoffquellen Glucose und Succinat.

Im Vergleich zur Referenz besitzen die meisten Reaktionen der Glykolyse daher beim modellierten Wachstum auf Succinat nur eine untergeordnete Rolle. Diese sind nur relevant, wenn sie im Rahmen der Gluconeogenese benötigt werden. Umso wichtiger sind der Citratzyklus als zentraler Stoffwechselweg für

Katabolismus und Anabolismus sowie die Atmungskette, die nahezu die gesamte Energie im Modell bereitstellt. Die Enzyme Succinat-Dehydrogenase (EC 1.3.5.1) und Fumarat-Hydratase (EC 4.2.1.2) sind essentiell für den Abbau von Succinat, da jeglicher Kohlenstofffluss durch diese Reaktionen fließen muss.

3.2.2.4 Phenylacetat

Die aromatische Verbindung Phenylacetat ist in der Umwelt ubiquitär vorhanden und entsteht oft durch den Abbau aromatischer Schadstoffe, wie Styrol, oder aber durch den aeroben Abbau der Aminosäure Phenylalanin [169–171]. Phenylacetat stellt damit für viele Mikroorganismen eine interessante Kohlenstoffquelle dar.

Wachstumsrate

Die vorhergesagte Wachstumsrate für das Wachstum auf Phenylacetat als alleiniger Kohlenstoffquelle beträgt $0,22 \text{ h}^{-1}$ und ist damit der experimentell bestimmten Wachstumsrate sehr nahe. Die im Folgenden untersuchten Flüsse innerhalb des Modells weisen demnach eine hohe Konfidenz auf.

Kohlenstoffbilanz und Zentralstoffwechsel

Die Kohlenstoffaufnahme beim modellierten Wachstum auf Phenylacetat ist mit $29,3 \text{ mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ geringer als beim modellierten Wachstum auf Glucose (Vergleich: $38,6 \text{ mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Die Aufnahme des Phenylacetat erfolgt in *T. thermophilus* über einen aktiven ABC-Transporter [172] und der Abbau des Substrats über einen weit verbreiteten bakteriellen Abbauweg für Phenylacetat [171]. Das erste Enzym dieses Stoffwechselweges, die Phenylacetat-CoA-Ligase (EC 6.2.1.30), wurde in *T. thermophilus* HB27 bereits biochemisch charakterisiert [170]. Über diesen Abbauweg werden pro Molekül aufgenommenem Phenylacetat ein Molekül Succinyl-CoA, zwei Moleküle Acetyl-CoA und ein Molekül CO_2 produziert (Abbildung 22). Die Produkte Acetyl-CoA und Succinyl-CoA fließen anschließend mit denselben Kohlenstoffanteilen in den Citratzyklus ein. Ähnlich zum modellierten Wachstum auf Succinat (Kapitel 3.2.2.3) werden alle anabolen Stoffwechselwege vom Citratzyklus bedient. Der meiste Kohlenstoff wird im Modell ausgehend vom Citratzyklus wie folgt verwendet:

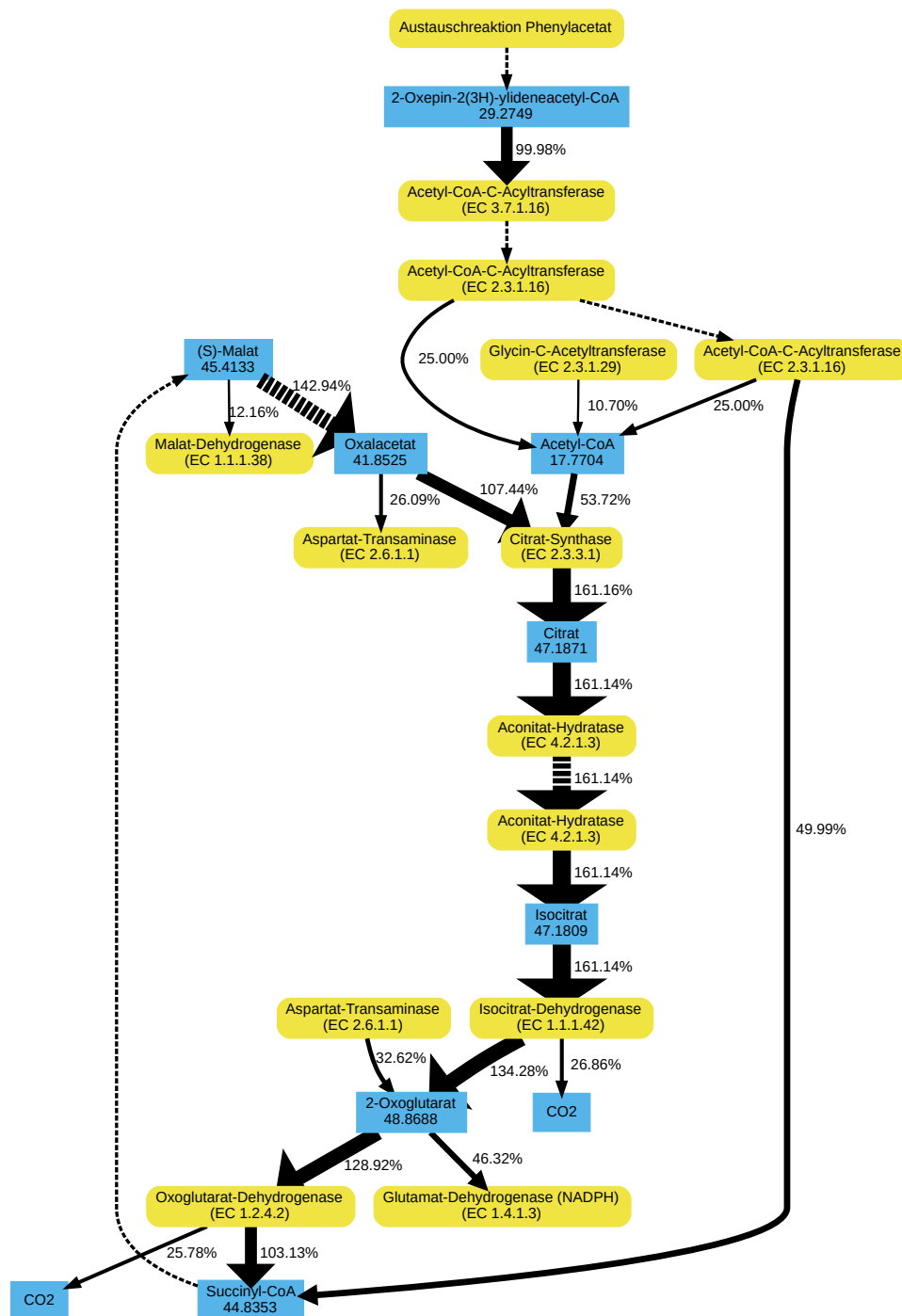


Abbildung 22: Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse im Modell von *T. thermophilus* HB27 für das Wachstum auf Phenylacetat als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Kohlenstoffflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in mmol C · g_{BTM}⁻¹ · h⁻¹ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Kohlenstoffflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Kohlenstoff, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 10 % werden nicht angezeigt.

- 52,6 % des Kohlestoffs werden im Citratzyklus für die Reduzierung von Reduktionsäquivalenten und Menachinon zu CO_2 abgebaut.
- 19,1 % des Kohlenstoffs werden als Oxalacetat aus dem Citratzyklus abgeführt und über eine Reihe von Aminosäure produzierenden und abbauenden Reaktionen zu CO_2 und Acetyl-CoA abgebaut. Erst wird ausgehend von Oxalacetat Aspartat synthetisiert, aus welchem wiederum Threonin produziert wird. Dieses kann in Acetyl-CoA und Glycin gespalten werden. Das Glycin wiederum wird über das Glycin spaltende System abgebaut. Das darüber gebildete überschüssige Serin wird zu Pyruvat und dieses über die oxidative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA und CO_2 abgebaut. Diese Aneinanderreihung von Reaktionen ist thermodynamisch durchaus möglich, da niemals dieselben Stoffwechselwege für Auf- und Abbau einer Aminosäure verwendet werden. Es liegt also kein thermodynamisch verbotener Kreislauf vor (Kapitel 2.2.4). Über diese Reaktionen wird Oxalacetat letztlich zu Acetyl-CoA (14,9 %) und CO_2 (4,7 %) abgebaut, wodurch NADH regeneriert werden kann. Die fehlenden etwa 7,0 % des Kohlenstoffs verbleiben in Form der Aminosäuren Aspartat, Threonin, Glycin und Serin.
- 9,4 % des Kohlenstoffs werden über die kataplerotische Reaktion der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (EC 4.1.1.49) den anabolen Stoffwechselwegen Gluconeogenese und PPP sowie Aminosäure-Biosynthesewegen zugeführt. Dabei werden 2,3 % des Gesamtkohlenstoffs zu CO_2 abgebaut.
- 6,7 % des Kohlestoffs werden netto für die kataplerotische Reaktion der Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.38) aus dem Citratzyklus abgeführt und als Pyruvat für die Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren (5,8 %) sowie Alanin (1,2 %) benötigt. Es werden zwar brutto 12,2 % des Kohlenstoffs als Malat aus dem Citratzyklus abgeführt, ein gewisser Anteil von 1,3 % wird jedoch über die oxidative Decarboxylierung in Form von Acetyl-CoA wieder in den Citratzyklus zurückgeführt. Die übrigen 3,7 % des abgeführten Kohlenstoffs werden durch diese Prozesse zu CO_2 abgebaut.

- 5,0 % des Kohlenstoffs werden netto für die Synthese von Glutamat, Glutamin und Nukleotiden als 2-Oxoglutarat aus dem Citratzyklus abgezweigt. Es verlässt zwar ein großer Anteil des Kohlenstoffs den Citratzyklus in Form von 2-Oxoglutarat (46,3 %), dieses wird jedoch als Produkt diverser Transaminierungsreaktionen wieder in den Citratzyklus zurückgeführt (41,3 %).

Energiestoffwechsel

Das kombinierte P/O-Verhältnis ist im Phenylacetat-Szenario mit einem Wert von 1,85 geringer gegenüber der Referenz (Vergleich 2,38). Wie auch im Succinat-Szenario deutet dies darauf hin, dass das Verhältnis von Succinat gegenüber NADH als Elektronendonator steigt. Der vorhergesagte Sauerstoffverbrauch liegt bei 20,7 gegenüber 13,2 mmol O₂ · g_{BTM}⁻¹ · h⁻¹ in der Referenz und ist damit erhöht [151]. Das Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf Phenylacetat könnte daher wie auch das Wachstum auf Succinat sauerstofflimitiert sein. Anhand der Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH (Tabelle 10) ist ersichtlich, dass der ATP-Verbrauch im Phenylacetat-Szenario mit 67 % am größten für den Energiehaushalt (GAM und NGAM) ist. Der nächstgrößere Anteil an ATP muss in die Aufnahme und den Abbau des Phenylacetat investiert werden (23 %). Produziert wird ATP im Phenylacetat-Szenario nahezu ausschließlich über den Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung. Hierfür werden gegenüber der Referenz größere Mengen an NADH in der Atmungskette verbraucht. Das NADH wiederum wird zu 69 % im Citratzyklus produziert und weitere 14 % des NADH stammen aus dem dedizierten Phenylacetat-Abbauweg. Weitere 12 % des NADH werden im Modell durch den oben beschriebenen kombinierten Abbau der Aminosäuren Aspartat, Threonin, Glycin und Serin unter Beteiligung des Glycin spaltenden Systems und der oxidativen Decarboxylierung gewonnen. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die NADPH produzierenden und verbrauchenden Reaktionen, wird ersichtlich, dass im Modell offenbar ein Überschuss an NADPH vorliegt, der nicht sinnvoll für anabole Stoffwechselwege verwendet werden kann

Tabelle 10: Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf Glucose und Phenylacetat als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Die Gesamtflüsse der jeweiligen Metabolite für Glucose bzw. Phenylacetat betragen 56,1865 / 48,1003 (ATP), 28,6041 / 26,0451 (NADH) und 6,8915 / 10,5729 (NADPH) mmol · g_{BTM}⁻¹ · h⁻¹. Aufgelistet sind die relativen Anteile spezifischer Metabolit produzierender und verbrauchender Reaktionen. Nicht aufgelistet sind Relative Flüsse kleiner als 6 % sowie Reaktionen, die ausschließlich beim modellierten Wachstum auf Glucose aktiv sind.

Reaktion / Enzym	EC-Nummer	Stoffwechselweg	Anteil in Szenario	
			Glucose	Phenylacetat
ATP – produzierend				
ATP-Synthase	3.6.3.14	Atmungskette	55,5%	77,8%
Succinat-CoA-Ligase	6.2.1.5	Citratzyklus	6,4%	22,2%
ATP – verbrauchend				
GAM	-	Energiehaushalt	46,5%	23,8%
NGAM	-	Energiehaushalt	7,4%	39,3%
Adenylat-Kinase	2.7.4.3	Nukleotid-Synthese	0,0%	7,9%
ABC-Transporter (Substrat)	-	Transport	11,4%	7,2%
Phenylacetat-CoA-Ligase	6.2.1.30	Phenylacetat-Abbau	0,0%	7,2%
NADH – produzierend				
Dihydrolipoyl-Dehydrogenase	1.8.1.4	Oxidative Decarboxylierung	29,2%	6,3%
Malate-Dehydrogenase	1.1.1.37	Citratzyklus	13,7%	40,1%
Oxoglutarat-Dehydrogenase	1.2.4.2	Citratzyklus	12,6%	29,0%
3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase	1.1.1.35	Phenylacetat-Abbau	0,0%	14,0%
L-Threonine-3-Dehydrogenase	1.1.1.103	Threonin-Abbau	0,0%	6,0%
NADH – verbrauchend				
NADH-Dehydrogenase	1.6.5.3	Atmungskette	78,7%	92,3%
NADPH – produzierend				
Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.42	Citratzyklus	62,3%	67,8%
3-Oxo-5,6-dehydrosuberyl-CoA-Semialdehyd-Dehydrogenase	1.17.1.7	Phenylacetat-Abbau	0,0%	31,6%
NADPH – verbrauchend				
Glutamat-Dehydrogenase (NADPH)	1.4.1.3	Aminosäuren	41,8%	23,4%
3-Oxoacyl-[ACP]-Reduktase (3x)	1.1.1.100	Fettsäure-Synthese	21,8%	6,0%
Ketolat-Reduktoisomerase	1.1.1.86	Aminosäuren	8,8%	2,4%
Phenylacetyl-CoA-1,2-Epoxidase	1.14.13.149	Phenylacetat-Abbau	0,0%	31,6%
Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	1.2.1.11	Aminosäuren	3,3%	14,5%
Homoserin-Dehydrogenase	1.1.1.3	Aminosäuren	0,0%	14,5%

und deswegen unter Energieverlust zu NADH umgewandelt wird. Dies ist daran zu erkennen, dass 29 % des NADPH für die Synthese von Threonin investiert werden. Dieses kann nur zu einem Bruchteil in der Biomassereaktion verbraucht werden. Der Rest wird über die oben beschriebene Aneinanderreihung von Reaktionen zu NADH, Acetyl-CoA und CO₂ abgebaut. Der Überschuss an NADPH wird zu 100 % durch den hohen Fluss der NADP⁺-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) im Citratzyklus generiert, da im Phenylacetat-Abbauweg netto genauso viel NADPH durch die Phenylacetyl-CoA-1-2-Epoxidase (EC 1.14.13.149) verbraucht wird wie durch die 3-Oxo-5,6-dehydrosuberil-CoA-semialdehyde-Dehydrogenase (EC 1.17.1.7 / EC 1.2.1.91) [171] produziert wird.

Signifikante Änderungen gegenüber der Referenz

Abgesehen von den direkt am Abbau oder am Transport von Phenylacetat und Glucose beteiligten Reaktionen sind laut suboptimaler FVA (Abbildung 23) im Phenylacetat-Szenario die Flüsse durch vier Enzyme des Citratzyklus, die Sauerstoffaufnahme und durch die Reaktionen der Atmungskette mit Ausnahme der NAD(P)H-Transhydrogenase (EC 1.6.1.2) signifikant erhöht. Bei den Enzymen des Citratzyklus handelt es sich um die Succinat-Dehydrogenase (EC 1.3.5.1), Fumarat-Hydratase (EC 4.2.1.2), Citrat-Synthase (EC 2.3.3.1) und Aconitat-Hydratase (EC 4.2.1.3). Diese Reaktionen katalysieren zum Einen die Umsetzung von Succinat zu Malat und zum Anderen von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Isocitrat. Diese Reaktionen befinden sich in unmittelbarer Nähe zu den Eintrittspunkten von Acetyl-CoA und Succinyl-CoA, den Produkten des Phenylacetat-Abbauwegs, in den Citratzyklus und müssen daher im Phenylacetat-Szenario höhere Flüsse aufweisen. Die Flüsse durch die Atmungskette sind beim modellierten Wachstum auf Phenylacetat signifikant erhöht, da im Phenylacetat-Abbauweg selbst kein ATP sondern nur Reduktionsäquivalente gebildet werden. Signifikant niedrigere Flüsse gegenüber der Referenz werden hingegen für sechs Reaktionen der Glykolyse vorhergesagt. Diese Reaktionen sind aufgrund der fehlenden Glucose im Phenylacetat-Szenario nicht relevant. Laut suboptimaler MFM sind im Phenylacetat-Szenario die minimalen Flüsse von 24 Metaboliten

signifikant gegenüber der Referenz verändert. Bei 10 davon handelt es sich um die Intermediate des Phenylacetat-Abbauwegs, deren Mindestflüsse alle erhöht sind. Der Mindestfluss durch den Metaboliten AMP ist ebenfalls erhöht, da er im Phenylacetat-Abbauweg durch die Reaktion der Phenylacetat-CoA-Ligase (EC 6.2.1.30) anfällt und in der Referenz nur einen sehr kleinen Fluss aufweist. Der Mindestfluss durch Glucose hingegen ist gegenüber der Referenz null, da dieser Metabolit im Phenylacetat-Szenario nicht vorkommt. Die Mindestflüsse der Citratzyklus-Intermediate Succinat, Succinyl-CoA, Fumarat und Malat sind erhöht, da nach dem Einschleusen des Succinyl-CoA aus dem Phenylacetat-Abbauweg in den Citratzyklus erst Malat wieder einen Verzweigungspunkt darstellt (Abbildung 22). Ebenfalls erhöht sind die Mindestflüsse der Gluconeogenese-Intermediate Fructose, 3-Phospho-D-glycerat, 2-Phospho-D-glycerat, 1,3-Bisphospho-D-glycerat, Dihydroxyacetonphosphat und Fructose-1,6-bisphosphat, da ohne Gluconeogenese keine Hexosen gebildet werden könnten. Der Metabolit D-Glyceraldehyd-3-phosphat weist gegenüber der Referenz einen niedrigeren Mindestfluss auf. Er ist in beiden Szenarien aktiv, da er Teil der Glykolyse und Gluconeogenese ist. Außerdem sinkt gegenüber der Referenz der Mindestfluss durch den Metaboliten 2-Phenylacetamide auf null. Dieser Metabolit ist ein Intermediat eines Phenylalanin-Abbauwegs, welcher in der Referenz zur Synthese von Phenylacetat benötigt wird. Das Phenylacetat wiederum wird als Bestandteil der Zellwand von *T. thermophilus* HB27 benötigt [173].

Das modellierte Wachstum auf Phenylacetat weist Parallelen zum modellierten Wachstum auf Succinat auf. So sind die Reaktionen der Glykolyse im Phenylacetat-Szenario ebenfalls nur relevant, wenn sie im Rahmen der Gluconeogenese benötigt werden. Außerdem sind die Flüsse durch den Citratzyklus als zentralen Stoffwechselweg für Katabolismus und Anabolismus sowie die Atmungskette gleichermaßen erhöht. Im Unterschied zum Succinat-Szenario wird im Phenylacetat-Szenario jedoch neben Succinyl-CoA auch Acetyl-CoA produziert. Dies, sowie die niedrigere Wachstums- und Kohlenstoffaufnahme gegenüber dem Succinat-Szenario, sind vermutlich der Grund für den deutlich niedrigeren Fluss der oxidativen Decarboxylierung im

Phenylacetat-Szenario. Der NADPH-Überschuss im Modell wirft die Frage, auf ob die im Modell beobachteten Flüsse zur Umwandlung des NADPH zu NADH auch *in vivo* so ablaufen. Denkbare Alternativen wären, dass *T. thermophilus* HB27 das überschüssige NADPH in die Synthese kompatibler Solute wie Glutamat oder Mannosylglycerat investiert oder aber dass eine effizientere Möglichkeit der Umwandlung in diesem Organismus existiert. Erlaubt man im Modell die Umwandlung von NADPH zu NADH ohne jeglichen Energieverlust, steigt der vorhergesagte Biomassefluss allerdings nur geringfügig von $0,22 \text{ h}^{-1}$ auf $0,24 \text{ h}^{-1}$.

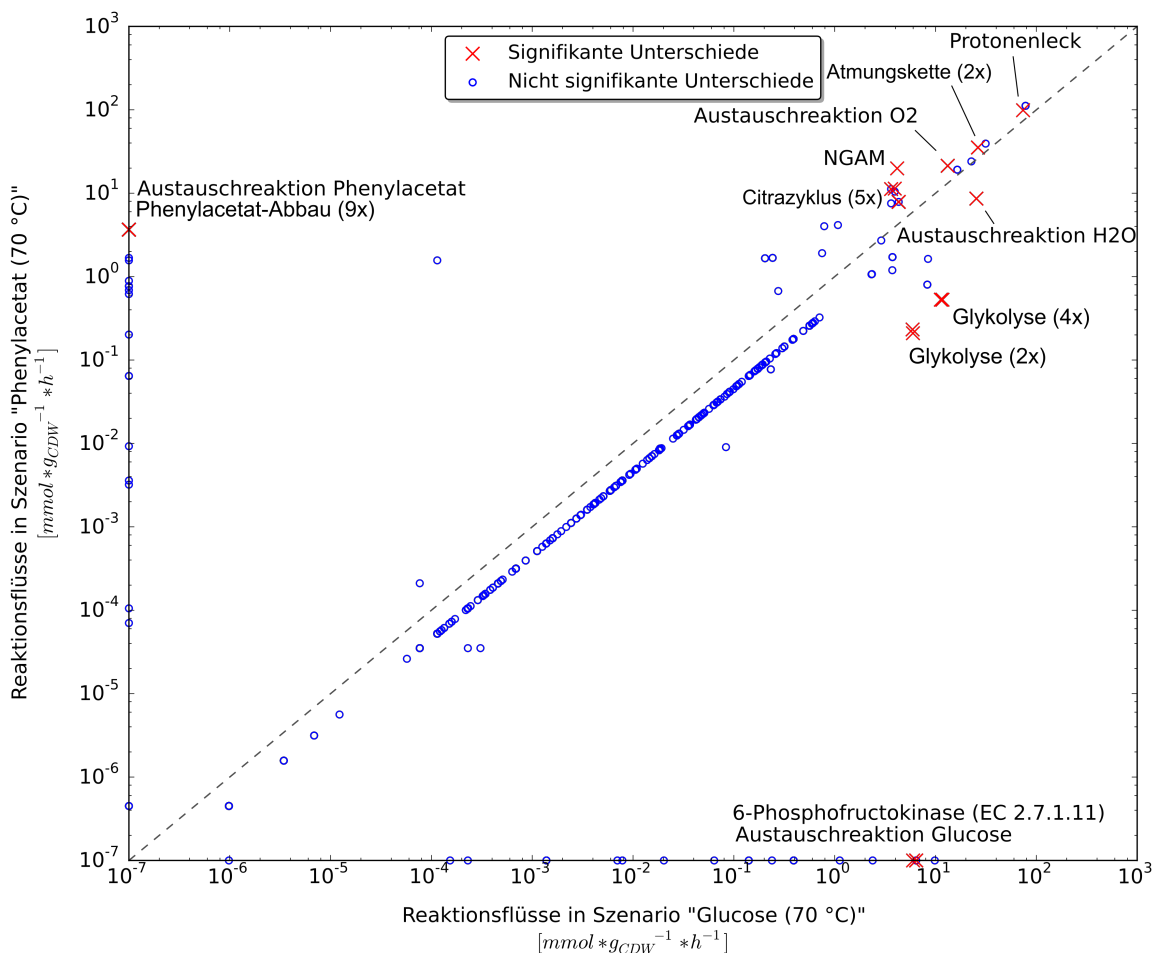


Abbildung 23: Vergleich der mittels suboptimaler FVA ermittelten signifikant veränderten Reaktionsflüsse beim modellierten Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf den alleinigen Kohlenstoffquellen Glucose und Phenylacetat.

Reaktionen desselben Stoffwechselweges wurden teilweise zusammengefasst (die Anzahl der Reaktionen ist dann in Klammern angegeben). Transportreaktionen werden nicht angezeigt, da sie bereits durch Austauschreaktionen repräsentiert sind.

3.2.2.5 3-Hydroxybutanoat

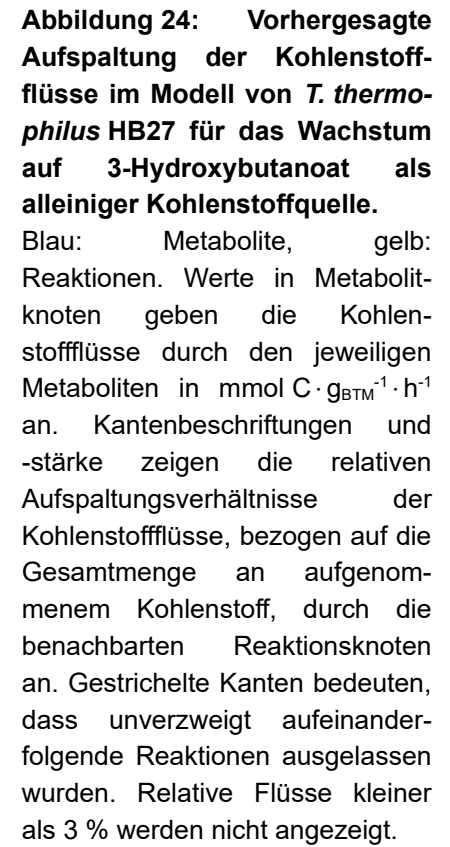
3-Hydroxybutanoat ist ein häufiger Bestandteil von bakteriellen Polyhydroxyalkanoaten (PHA). Diese werden von Mikroorganismen bei Vorhandensein von ausreichend Nährstoffen oft als Energie- und Kohlenstoffreserve verwendet und sind somit ubiquitär in der Umwelt vorhanden [174–177]. Auch *T. thermophilus* ist in der Lage PHA zu synthetisieren. Diese bestehen in dem Organismus beim Wachstum auf Glucose zu gut 10 % aus 3-Hydroxybutanoat [79]. Für die Zerlegung von PHA in einzelne Monomere werden spezielle Depolymerasen benötigt [178]. Nach der intra- oder extrazellulären Spaltung der PHA in monomere Hydroxyalkanoate können diese dann meist über den Fettsäurestoffwechsel metabolisiert und als Kohlenstoffquelle verwendet werden.

Wachstumsrate

Die vom Modell vorhergesagte Wachstumsrate für das Wachstum auf 3-Hydroxybutanoat als alleiniger Kohlenstoffquelle beträgt $0,075 \text{ h}^{-1}$ und liegt damit unter der experimentell bestimmten Wachstumsrate von $0,096 \text{ h}^{-1}$.

Kohlenstoffbilanz und Zentralstoffwechsel

Die Kohlenstoffaufnahme beim modellierten Wachstum auf 3-Hydroxybutanoat als alleiniger Kohlenstoffquelle beträgt $14,6 \text{ mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und ist damit im Vergleich zur Referenz deutlich geringer (Vergleich: $38,6 \text{ mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Im metabolischen Modell von *T. thermophilus* HB27 erfolgt der Abbau des 3-Hydroxybutanoat durch die Umwandlung zu Acetoacetyl-CoA und Spaltung dieser Verbindung zu zwei Einheiten Acetyl-CoA (Abbildung 24). Die Umwandlung des 3-Hydroxybutanoat zu Acetoacetyl-CoA erfolgt entweder über die 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.30) über das Intermediat Acetoacetat oder durch die Aktivierung des 3-Hydroxybutanoat über eine Acyl-CoA-Ligase (EC 6.2.1.3) ohne Bildung von Acetoacetat. Im Falle dieses Modells wurde entschieden, den Weg über die 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase in das Modell



zu integrieren, da nicht bekannt ist, ob eine Acyl-CoA-Ligase 3-Hydroxybutanoat als Substrat akzeptiert und da für ein anderes Bakterium, *Methylobacterium extorquens*, nachgewiesen wurde, dass Mutanten ohne 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase die Fähigkeit verlieren auf 3-Hydroxybutanoat als Substrat zu wachsen [179].

Das aus dem Abbau von 3-Hydroxybutanoat produzierte Acetyl-CoA fließt in verschiedene Stoffwechselwege ein. Der meiste Kohlenstoff im Modell wird dabei wie folgt über den Citratzyklus verteilt:

- 66,9 % des Kohlestoffs werden im Citratzyklus für die Reduzierung von Reduktionsäquivalenten und Menachinon zu CO₂ abgebaut.
- 23,2 % des Kohlenstoffs aus dem Acetyl-CoA werden über den Glyoxylat-Shunt zu Malat umgewandelt, um damit anabole Stoffwechselwege bedienen zu können und um – analog zum Phenylacetat-Szenario – Oxalacetat aus dem Citratzyklus abzuführen und über eine Reihe von Aminosäure produzierenden und abbauenden Reaktionen zu CO₂ und Acetyl-CoA abzubauen (Kapitel 3.2.2.4). Über diese Reaktionen wird Oxalacetat letztlich zu Acetyl-CoA und CO₂ (6,8 %) abgebaut, wodurch NADH regeneriert werden kann.
- 6,4 % des Kohlenstoffs werden über die kataplerotische Reaktion der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (EC 4.1.1.49) den anabolen Stoffwechselwegen Gluconeogenese und PPP sowie Aminosäure-Biosynthesewegen zugeführt. Dabei werden 2,3 % des Gesamtkohlenstoffs zu CO₂ abgebaut.
- 3,6 % des Kohlenstoffs werden netto für die Synthese von Glutamat, Glutamin und Nukleotiden als 2-Oxoglutarat aus dem Citratzyklus abgezweigt. Es verlässt zwar ein größerer Anteil des Kohlenstoffs den Citratzyklus in Form von 2-Oxoglutarat (46,3 %), dieses wird jedoch als Produkt diverser Transaminierungsreaktionen wieder in den Citratzyklus zurückgeführt (41,3 %).

Energiestoffwechsel

Das kombinierte P/O-Verhältnis ändert sich kaum zwischen dem modellierten Wachstum auf Glucose (2,38) und 3-Hydroxybutanoat (2,33). Auch die Sauerstoffaufnahme ist zwischen den Szenarien vergleichbar: $12,5 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (3-Hydroxybutanoat) gegenüber $13,2 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Glucose). Die Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH (Tabelle 11) zeigt, dass, wie auch beim Wachstum auf Phenylacetat, der Großteil des ATP im Modell über die Atmungskette (86 %) und den Citratzyklus (14 %) produziert wird. Benötigt wird ATP neben dem Energiehaushalt (56 %) vor allem für den Transport und die Umwandlung des 3-Hydroxybutanoat zu Acetyl-CoA (32,7 %). Das fast ausschließlich in der Atmungskette benötigte NADH (97 %) wird zum Großteil im Citratzyklus generiert (68 %). Über die Oxidation des 3-Hydroxybutanoat selbst wird etwa ein Fünftel des NADH produziert (19 %). Geringere Mengen NADH werden über die Umwandlung von NADPH zu NADH (7 %) und die oxidative Decarboxylierung (5 %) generiert. Das NADPH wiederum stammt analog zum Phenylacetat-Szenario fast vollständig aus dem Citratzyklus (~ 100 %). Beim modellierten Wachstum auf 3-Hydroxybutanoat wird jedoch der Großteil des NADPH (53 %) nicht für anabole Stoffwechselwege verwendet, sondern fließt in die Umwandlung von NADPH zu NADH über die Threonin-Biosynthese.

Signifikante Änderungen gegenüber der Referenz

Abgesehen von den direkt am Transport oder dem Abbau von Glucose und 3-Hydroxybutanoat beteiligten Reaktionen sind laut suboptimaler FVA nur die Flüsse durch die vier Enzyme Succinat-Dehydrogenase (EC 1.3.5.1), Fumarat-Hydratase (EC 4.2.1.2), Citrat-Synthase (EC 2.3.3.1) und Aconitat-Hydratase (EC 4.2.1.3) signifikant erhöht. Diese Enzyme des Citratzyklus befinden sich entweder direkt am Eintrittspunkt des aus dem Abbau von 3-Hydroxybutanoat produzierten Acetyl-CoA oder am Eintrittspunkt des über den Glyoxylat-Shunt

Tabelle 11: Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf Glucose und 3-Hydroxybutanoat als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Die Gesamtflüsse der jeweiligen Metabolite für Glucose bzw. Phenylacetat betragen 56,1865 / 32,2853 (ATP), 28,6041 / 18,7024 (NADH) und 6.8915 / 4.8992 (NADPH) mmol · g_{BTM}⁻¹ · h⁻¹. Aufgelistet sind die relativen Anteile spezifischer Metabolit produzierender und verbrauchender Reaktionen. Nicht aufgelistet sind relative Flüsse kleiner als 5 % sowie Reaktionen, die ausschließlich beim modellierten Wachstum auf Glucose aktiv sind.

3HB - 3-Hydroxybutanoat

Reaktion	EC-Nummer	Stoffwechselweg	Anteil in Szenario	
			Glucose	3HB
ATP – produzierend				
ATP-Synthase	3.6.3.14	Atmungskette	55,5%	85,8%
Succinat-CoA-Ligase	6.2.1.5	Citratzyklus	6,4%	14,2%
ATP – verbrauchend				
GAM	-	Energiehaushalt	46,5%	12,0%
NGAM	-	Energiehaushalt	7,4%	43,6%
Adenylat-Kinase	2.7.4.3	Nukleotid-Synthese	0,0%	11,1%
Acetat-CoA-Ligase	6.2.1.1	Acetat-Abbau	0,0%	10,8%
ABC-Transporter (Substrat)	-	Transport	11,4%	10,8%
NADH – produzierend				
Dihydrolipoyl-Dehydrogenase	1.8.1.4	Oxidative Decarboxylierung	29,2%	5,3%
Malate-Dehydrogenase	1.1.1.37	Citratzyklus	13,7%	43,2%
Oxoglutarat-Dehydrogenase	1.2.4.2	Citratzyklus	12,6%	25,2%
3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase	1.1.1.30	Polyhydroxyalkanoate	0,0%	19,1%
L-Threonine-3-Dehydrogenase	1.1.1.103	Threonin-Abbau	0,0%	6,7%
NADH – verbrauchend				
NADH-Dehydrogenase	1.6.5.3	Atmungskette	78,7%	96,5%
NADPH – produzierend				
Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.42	Citratzyklus	62,3%	99,5%
NADPH – verbrauchend				
Glutamat-Dehydrogenase (NADPH)	1.4.1.3	Aminosäuren	41,8%	33,8%
Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	1.2.1.11	Aminosäuren	3,3%	26,7%
Homoserin-Dehydrogenase	1.1.1.3	Aminosäuren	0,0%	26,7%
3-Oxoacyl-[ACP]-Reduktase (3x)	1.1.1.100	Fettsäure-Synthese	21,8%	4,7%
Ketolat-Reduktoisomerase	1.1.1.86	Aminosäuren	8,8%	1,9%

gebildeten Malat. Signifikant erniedrigt sind hingegen die Flüsse durch die oxidative Decarboxylierung, die Menachinon-Oxidase (EC 1.6.5.2) und den CO₂-Transport. Dies wird wahrscheinlich durch die geringe Kohlenstoffaufnahme verursacht, da diese letztlich auch die Atmungsrate und damit auch die CO₂-Produktion nach oben beschränkt. Laut suboptimaler MFM sind gegenüber der Referenz die Mindestflüsse durch 17 Metabolite signifikant verändert (Abbildung 25). Bei fünf von diesen handelt es sich um die Intermediate der Umwandlung von 3-Hydroxybutanoat zu Acetyl-CoA: 3-Hydroxybutanoat (extrazellulär), 3-Hydroxybutanoat, Acetoacetyl-CoA, Acetoacetat und Acetat. Der Mindestfluss durch Glucose hingegen ist gegenüber der Referenz null, da dieser Metabolit beim modellierten Wachstum auf 3-Hydroxybutanoat nicht vorkommt. Die Mindestflüsse der Citratzyklus-Intermediate Succinat, Malat und Citrat sowie der Mindestfluss von Glyoxylat sind signifikant erhöht. Dies ist dadurch zu begründen, dass erstens Citrat das erste Produkt des Citratzyklus nach dem Einschleusen von Acetyl-CoA ist und zweitens Succinat und Malat die Edukte bzw. Produkte des in diesem Szenario höchst aktiven Glyoxylat-Shunts sind. Die hohen Mindestflüsse dieser Metabolite zeigen, dass der Glyoxylat-Shunt wichtig für die Maximierung des Biomasseflusses in diesem Szenario ist. Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass der Fluss durch den CO₂-Transporter des Modells signifikant erniedrigt ist, denn durch den Glyoxylat-Shunt werden die CO₂ produzierenden Reaktionen der Citrat-Synthase übersprungen. Weiterhin erhöht sind die Mindestflüsse der Gluconeogenese-Intermediate Fructose, 3-Phospho-D-glycerat, 2-Phospho-D-glycerat, 1,3-Bisphospho-D-glycerat, Dihydroxy-acetonphosphat und Fructose-1,6-bisphosphat, da ohne Gluconeogenese keine Hexosen gebildet werden könnten. Die Metaboliten D-Glyceraldehyd-3-phosphat und Fructose-6-phosphat weisen gegenüber der Referenz niedrigere Mindestflüsse auf. Sie sind in beiden Szenarien aktiv, da sie Teil der Glykolyse und Gluconeogenese sind. Jedoch können die Flüsse durch diese Reaktionen im Rahmen der Gluconeogenese aufgrund des niedrigeren Biomasseflusses keine hohen Werte annehmen.

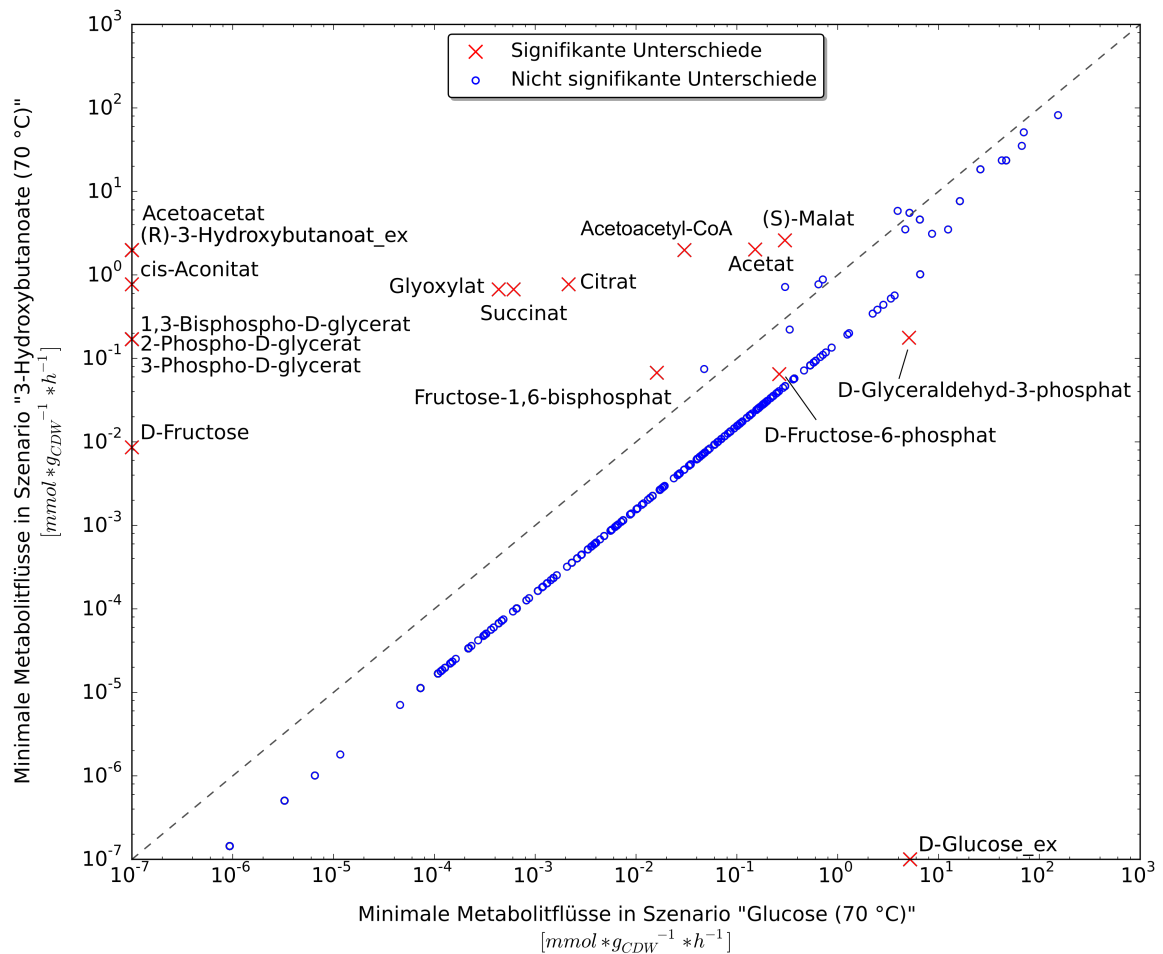


Abbildung 25: Vergleich der mittels suboptimaler MFM ermittelten signifikant veränderten Metabolitflüsse beim modellierten Wachstum von *T. thermophilus* HB27 auf den alleinigen Kohlenstoffquellen Glucose und 3-Hydroxybutanoat.

Das modellierte Wachstum auf 3-Hydroxybutanoat weist viele Parallelen zum modellierten Wachstum auf Phenylacetat auf. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Kohlenstoffaufnahme- und Wachstumsraten gegenüber der Referenz geringer sind. In beiden Szenarien spielt die Glykolyse eine untergeordnete Rolle, wohingegen die Gluconeogenese essentiell ist. Auch die Flüsse durch den Citratzyklus dienen in beiden Szenarien als zentraler Stoffwechselweg für Katabolismus und Anabolismus. Zudem wird auch in diesem Szenario ein Überschuss an NADPH produziert, der vom Modell teilweise in NADH umgewandelt wird. Erlaubt man im Modell in diesem Szenario die Umwandlung von NADPH zu NADH ohne jeglichen Energieverlust, steigt der

vorhergesagte Biomassefluss von $0,75 \text{ h}^{-1}$ auf $0,90 \text{ h}^{-1}$. Der Einfluss des NADPH-Überschusses ist in diesem Szenario also größer gegenüber dem Phenylacetat-Szenario. Ein weiterer Unterschied zum Phenylacetat-Szenario ist, dass ausschließlich Acetyl-CoA als zentraler Überträger für Kohlenstoff generiert wird. Dies macht es notwendig die CO_2 produzierenden Reaktionen des Citratzyklus mit Hilfe des Glyoxylat-Shunts zu umgehen, da sonst kein Kohlenstoff für anabole Stoffwechselwege zur Verfügung steht.

3.2.3 Auswirkungen temperaturabhängiger Parameter

Das metabolische Modell von *T. thermophilus* konnte im Rahmen dieser Arbeit um temperaturabhängige Parameter ergänzt werden, wodurch neben der bisher modellierten, optimalen Wachstumstemperatur von 70°C nun auch Vorhersagen für eine Wachstumstemperatur von 80°C getroffen werden können. Um die Auswirkungen der temperaturabhängigen Parameter auf die Flüsse innerhalb des Modells zu ermitteln, wurden Simulationen für beide Wachstumstemperaturen durchgeführt. Als alleinige Kohlenstoffquelle wurde Glucose gewählt. Außerdem wurden die für eine Wachstumstemperatur von 70°C optimierten GAM- und NGAM-Werte in beiden Szenarien verwendet, um eine bessere Vergleichbarkeit bezüglich der Effekte der temperaturabhängigen Parameter auf das Modell treffen zu können. Das Wachstumsszenario für 70°C wird im Folgenden als Referenz verwendet.

Tabelle 12: Vorhergesagte Biomasseflüsse und Integration von Kohlenstoff in Biomasse (Kohlenstoffbilanzen) für das Wachstum von *T. thermophilus* HB27 bei unterschiedlichen Temperaturen.

Temperatur [°C]	Biomassefluss [h ⁻¹]	Relativer Biomassefluss [%]	Kohlenstoff- bilanz [%]	CO ₂ -Export [%]
70	0,49	100,0	57,4	42,6
80	0,40	81,5	47,0	53,0

Tabelle 13: Übersicht über die vom metabolischen Modell vorhergesagte Verteilung von Kohlenstoff und Energie für das Wachstum von *T. thermophilus* HB27 bei 70 °C und 80 °C.

	70 °C	80 °C
Verlust von ATP-Äquivalenten durch Protonenleck [mmol ATP · g _{BTM} ⁻¹ · h ⁻¹]	32,11	64,24
Anteil des aufgenommenen Kohlenstoffs, der für die Lipid-Synthese verwendet wird [%]	8,05	9,14
Kohlenstoffanteil der Lipide an der Biomasse [%]	14,02	19,45

Wachstumsrate, Kohlenstoffbilanz und Zentralstoffwechsel

Beim Vergleich der vorhergesagten Biomasse- und Kohlenstoffflüsse beider Szenarien (Tabelle 12) fällt auf, dass bei der höheren Wachstumstemperatur von 80 °C mehr Kohlenstoff in Form von CO₂ exportiert wird. Daher fallen auch die Integration von Kohlenstoff in die Biomasse sowie der Biomassefluss in diesem Szenario deutlich geringer aus. Vergleicht man die vorhergesagten Biomasseflüsse von 0,49 h⁻¹ für 70 °C bzw. 0,40 h⁻¹ für 80 °C mit zur Verfügung gestellten experimentellen Wachstumsraten von 0,50 h⁻¹ bzw. 0,27 h⁻¹ (Carolin Nienhagen, persönliche Mitteilung, 2014), so ist die Übereinstimmung für das simulierte Wachstum bei 70 °C am größten. Die Verringerung der Wachstumsrate bei einer Wachstumstemperatur von 80 °C wird von dem Modell zwar ebenfalls deutlich vorhergesagt, jedoch nicht in dem Ausmaß wie sie experimentell beobachtet wurde. Ursächlich für den verringerten Biomassefluss bei 80 °C sind die beiden im Modell befindlichen temperaturabhängigen Parameter, das heißt die veränderte Biomassezusammensetzung sowie das Protonenleck während der Respiration. Diese Parameter üben einen starken Einfluss auf den Energie- und Kohlenstoffhaushalt des Modells aus (Tabelle 13). Da der Lipidanteil an der Biomasse in diesem Szenario erhöht ist und vermehrt längere und verzweigtkettige Fettsäuren benötigt werden, steigt sowohl der relative Kohlenstoffgehalt der Lipidfraktion als auch der relative Anteil der Lipide an der Biomasse. Ein Effekt hiervon ist, dass trotz des geringeren Biomasseflusses im Vergleich zur simulierten Wachstumstemperatur von 70 °C der Anteil des

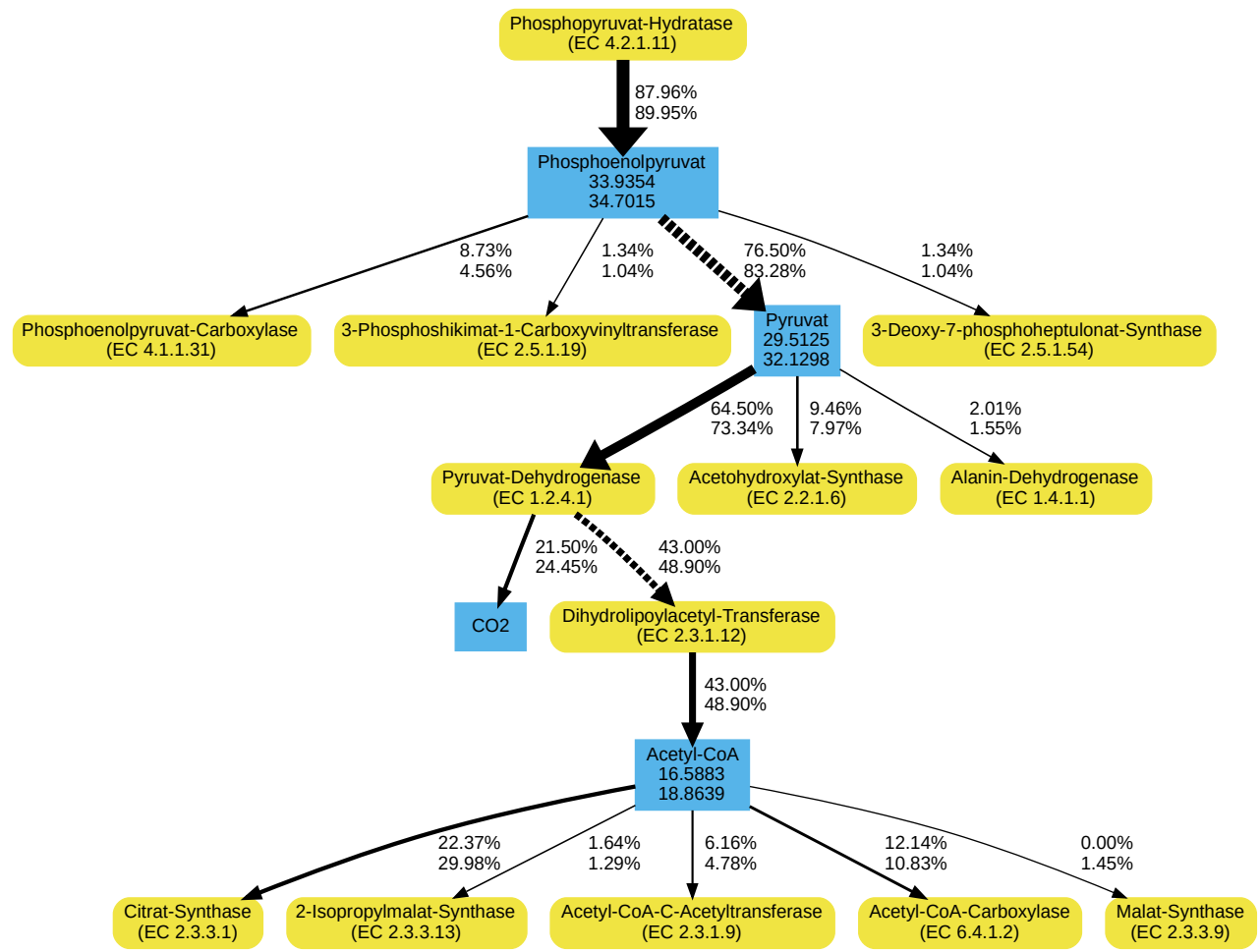
aufgenommenen Kohlenstoffes, der für die Lipidsynthese verwendet wird, um etwa 14% steigt. Das Protonenleck wiederum besitzt einen starken Einfluss auf den Energiehaushalt des Modells von *T. thermophilus*. Unter Berücksichtigung des Protonenlecks und der NGAM von $4,16 \text{ mmol ATP} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ in beiden Szenarien erhöht sich der effektive Verlust an ATP für eine Wachstumstemperatur von 80 °C gegenüber 70 °C von 36,3 auf 68,4 $\text{mmol ATP} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ – eine sehr hohe Steigerung um 89%. Aus den Kohlenstoffflüssen im Zentralstoffwechsel des Modells (Abbildung 26) ist ersichtlich, dass höhere Anteile an Kohlenstoff in den Citratzyklus geleitet werden und gleichzeitig anabole Stoffwechselwege (Shikimat-, Serin-, Valin-, Leucin-Biosynthese) sowie die anaplerotische Reaktion der PEP-Carboxylase (EC 4.1.1.31) mit weniger Kohlenstoff bedient werden.

Signifikante Änderungen gegenüber der Referenz

Im Folgenden werden die mittels optimaler FVA ermittelten signifikanten Änderungen zwischen dem simulierten Wachstum bei 70 °C und 80 °C aufgeführt (Anhang 6). So sind bei 80 °C die Flüsse durch viele Reaktionen der Lipid-Biosynthese erhöht. Ebenfalls erhöht sind die Flüsse durch Reaktionen für den Abbau von Vorstufen der verzweigtkettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin. Die Acyl-CoA-Verbindungen aus dem Abbau dieser Verbindungen werden im Modell als Startermoleküle für die Synthese verzweigtkettiger Fettsäuren benötigt. Während der Fluss durch die ATP-Synthase bei 80 °C stark vermindert ist, sind die Flüsse durch Reaktionen zur Sauerstoffaufnahme, Reaktionen des Citratzyklus und durch Reaktionen für den Aufbau des Protonengradienten deutlich erhöht. Der Fluss durch die anaplerotische Reaktion der PEP-Carboxylase (EC 4.1.1.31) muss bei 80 °C einen deutlich niedrigeren Fluss aufweisen, sodass weniger HCO_3^- fixiert wird. Auf der anderen Seite kann bei 80 °C im Gegensatz zu 70 °C der Glyoxylat-Shunt aktiv werden (Abbildung 26), ohne dass es zu einer Verminderung des Biomasseflusses kommt.

Abbildung 26: Vergleich der vorhergesagten Aufspaltung von Kohlenstoffflüssen im Modell von *T. thermophilus* HB27 für das Wachstum bei 70 °C und 80 °C an den metabolischen Verzweigungspunkten Phosphoenolpyruvat, Pyruvat und Acetyl-CoA.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Kohlenstoffflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in der Einheit $\text{mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Kohlenstoffflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Kohlenstoff, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 1 % werden nicht angezeigt. Obere Nummern geben die Werte für das simulierte Wachstum bei 70 °C und untere Nummern die Werte für 80 °C an.



Energiestoffwechsel

Das kombinierte P/O-Verhältnis (die Effizienz der Atmungskette) sinkt beim modellierten Wachstum bei 80 °C stark auf einen Wert von nur 1,3 (Referenz: 2,38). Dies ist allerdings nicht auf die unterschiedliche Verwendung von Succinat und NADH als Reduktionsäquivalente zurückzuführen, sondern stattdessen auf die unterschiedlichen Flussraten des Protonenlecks, da dieses in Abhängigkeit von Temperatur und Atmungsrate das P/O-Verhältnis negativ beeinflusst. Ein weiterer deutlicher Unterschied im Energiestoffwechsel des Modells (Tabelle 14) betrifft den Metaboliten NADPH. Dieser Elektronenüberträger wird bei 80 °C nahezu ausschließlich über die in *T. thermophilus* NADP⁺-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) regeneriert, wohingegen bei 70 °C ein Drittel des NADPH unter NADH-Verbrauch zusätzlich über die NAD(P)H-Transhydrogenase (EC 1.6.1.2) regeneriert werden muss. NADH wiederum wird bei 80 °C vermehrt über den Citratzyklus regeneriert. Trotz der hohen Atmungsrate bei 80 °C wird der Großteil des ATP in diesem Szenario nicht über die ATPase, sondern über Glykolyse und Citratzyklus gebildet.

Die hier beschriebenen Vorhersagen lassen einige Rückschlüsse auf den Stoffwechsel von *T. thermophilus* HB27 bei erhöhten Temperaturen zu. Der vermehrte Bedarf an Lipiden im Allgemeinen und komplexeren Lipiden im Speziellen verändert die Kohlenstoffflüsse im Modell. Es wird trotz des niedrigeren Biomasseflusses bei 80 °C nahezu gleichbleibend viel Acetyl-CoA für die Fettsäure-Biosynthese benötigt und die Flüsse für die Synthese und den Abbau von Vorstufen verzweigtkettiger Aminosäuren steigen leicht. Letztendlich steigt der Kohlenstoffanteil in der Biomasse durch diese Anpassungen leicht an. Der Verlust an osmotischem Potential durch den ATPase-unabhängigen Rückstrom von Protonen [145] bedeutet bereits bei 70 °C einen sehr hohen Energieverlust, welcher sich bei einer modellierten Temperaturerhöhung um 10 °C nahezu verdoppelt. Die Atmungsrate und der Sauerstoffverbrauch steigen durch das niedrigere P/O-Verhältnis enorm an. Dass dieser Energieverlust nicht zum

Tabelle 14: Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von *T. thermophilus* HB27 bei 70 °C und 80 °C auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Die Gesamtflüsse der jeweiligen Metabolite für 70 °C bzw. 80 °C betragen 56,1865 / 49,9148 (ATP), 28,6041 / 32,7515 (NADH) und 6,8915 / 5,7571 (NADPH) mmol · g_{BTM}⁻¹ · h⁻¹. Aufgelistet sind die relativen Anteile spezifischer Metabolit produzierender und verbrauchender Reaktionen. Relative Flüsse kleiner 5 % sind nicht aufgeführt.

Reaktion	EC-Nummer	Stoffwechselweg	Anteil in Szenario	
			70 °C	80 °C
ATP – produzierend				
ATP-Synthase	3.6.3.14	Atmungskette	55,5%	45,4%
Phosphoglycerat-Kinase	2.7.2.3	Glykolyse	20,7%	23,5%
Pyruvat-Kinase	2.7.1.40	Glykolyse	17,4%	21,2%
Succinat-CoA-Ligase	6.2.1.5	Citratzyklus	6,4%	9,9%
ATP – verbrauchend				
GAM	-	Energiehaushalt	46,5%	42,5%
Glucokinase	2.7.1.2	Glykolyse	11,4%	12,7%
ABC-Transporter (Glucose)	-	Transport	11,4%	12,7%
6-Phosphofructokinase	2.7.1.11	Glykolyse	10,6%	12,0%
NGAM	-	Energiehaushalt	7,4%	8,2%
NADH – produzierend				
Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	1.2.1.12	Glykolyse	40,6%	35,9%
Dihydrolipoyl-Dehydrogenase	1.8.1.4	Oxidative Decarboxylierung	29,2%	29,0%
Malate-Dehydrogenase	1.1.1.37	Citratzyklus	13,7%	17,5%
Oxoglutarat-Dehydrogenase	1.2.4.2	Citratzyklus	12,6%	15,0%
NADH – verbrauchend				
NADH-Dehydrogenase	1.6.5.3	Atmungskette	78,7%	90,3%
NAD(P)H-Transhydrogenase	1.6.1.2	Atmungskette	8,3%	0,0%
NADPH – produzierend				
Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.42	Citratzyklus	62,3%	96,9%
NAD(P)H-Transhydrogenase	1.6.1.2	Atmungskette	34,4%	0,0%
NADPH – verbrauchend				
Glutamat-Dehydrogenase (NADPH)	1.4.1.3	Aminosäuren	41,8%	39,5%
3-Oxoacyl-[ACP]-Reduktase (3x)	1.1.1.100	Fettsäure-Synthese	21,8%	20,8%
Ketolat-Reduktoisomerase	1.1.1.86	Aminosäuren	8,8%	9,0%

Abbruch des Wachstums führt, ist sicherlich auf die ansonsten effiziente Atmungskette des Organismus zurückzuführen. Die für die ATP-Regeneration verantwortliche ATPase in *T. thermophilus* ist mit einem *in vitro* Protonenverbrauch von 2,3 H⁺ äußerst effizient [145] und weist eine hohe Ähnlichkeit zu V-Typ ATPasen auf, die sonst nur aus Eukaryoten und Archaeen bekannt sind [180]. Durch die Anpassung der Biomassezusammensetzung sowie des erhöhten Energieverlustes durch den Protonen-Leckfluss konnten zusätzliche Freiheitsgrade in das Modell integriert werden. Diese wiederum erlauben zuverlässigere Vorhersagen für Szenarien in denen nicht alle experimentellen Parameter, wie die NGAM, bekannt sind. Gleichzeitig ist jedoch auch ersichtlich, dass ohne die Kenntnis aller Parameter experimentell beobachtbare Phänotypen (wie die für 80 °C beobachtete Wachstumsrate) durch solche Modelle nicht vollständig reproduziert werden. Im konkreten Fall ist denkbar, dass die verminderte Löslichkeit von Sauerstoff bei erhöhten Temperaturen [167,168] die Atmungsrate und damit das Wachstum des im Vergleich zu anderen thermophilen Prokaryoten vergleichsweise schnell wachsenden Bakteriums *T. thermophilus* HB27 weiter einschränkt. Mit den gegebenen Modellparametern müsste die Sauerstoffaufnahmerate für 80 °C auf $11,8 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ beschränkt werden, um die experimentell beobachtete Wachstumsrate von $0,27 \text{ h}^{-1}$ zu reproduzieren. Dies entspricht etwa 90% der Sauerstoffaufnahmerate von $13,2 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, welche vom Modell für die Wachstumstemperatur von 70 °C vorhergesagt wird. Da die Atmung den Großteil der chemischen Energie in *T. thermophilus* bereitstellt, diese Kapazität aber für eine Wachstumstemperatur von 80 °C offensichtlich nicht ausgeschöpft wird, muss daher die Verfügbarkeit von Sauerstoff einschränkt oder Kohlenstoff in Form synthetisierter organischer Moleküle ausgeschleust werden (oder beides). So wurde vereinzelt der Export von Lactat beim Wachstum des Organismus bei 70 °C auf Glucose-Minimalmedium festgestellt [74]. In der Arbeitsgruppe konnte der Export von Lactat bei einer Wachstumstemperatur von 70 °C allerdings bisher beobachtet werden, sodass diese Hypothese für das Wachstum bei 80 °C unbedingt experimentell überprüft werden sollte.

3.3 Modellierung von *Sulfolobus solfataricus*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein metabolisches Modell des hyperthermophilen Crenarchaeons *S. solfataricus* P2 verwendet, um den Stoffwechsel des Organismus beim Wachstum auf verschiedenen Substraten detailliert zu charakterisieren. Hierdurch konnten Hypothesen aufgestellt werden, zur Aufklärung des Abbaus von L-Fucose und Caseinhydrolysat durch den Organismus beigetragen haben [181,182]. Das metabolische Modell von *S. solfataricus* P2 wurde 2012 entwickelt [92,118] und seitdem im Rahmen des SulfoSYS_{BIOTEC} Projektes¹⁹ grundlegend überarbeitet und erweitert.

3.3.1 Erweiterung und Validierung des Modells

Im Rahmen der Überarbeitung des Modells von *S. solfataricus* wurde die Nomenklatur des Modells von *T. thermophilus* [73] übernommen (Kapitel 2.1.6), was die Analyse des Modells sowie weitere Änderungen vereinfacht. Insgesamt weisen nun 68% aller Reaktionen einen direkten Bezug zur der integrierten Reaktions-Datenbank BKM-react [107] auf. Eine Auflistung aller im metabolischen Modell von *S. solfataricus* P2 verwendeten Abkürzungen findet sich im Anhang (Anhang 4). Weiterhin konnte der Umfang des metabolischen Modells in dieser Arbeit deutlich vergrößert werden. Die Anzahl integrierter Reaktionen, Metabolite und Gene ist daher deutlich gestiegen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Aktueller Umfang des Modells von *S. solfataricus* P2.

	Ulas (2012)	Diese Arbeit
Reaktionen	718	1034
Gene (Anteil aller Gene)	515 (17 %)	607 (20 %)
Metabolite	705	805

Der Großteil der neu zum Modell hinzugefügten Reaktionen sind mit dem Kohlenhydrat- und Nukleotidstoffwechsel assoziiert (Abbildung 27). Als

¹⁹ SulfoSYS_{BIOTEC}, <http://www.sulfosys.com/>

Kohlenhydratstoffwechsel werden hier alle Reaktionen zusammengefasst, die zum Abbau unterschiedlicher Kohlenstoffquellen verwendet werden können. Darunter fallen sowohl Reaktionen des Zentralstoffwechsels (Entner-Doudoroff-Weg, Citratzyklus) als auch spezifische Substratabbauwege. Weiterhin wurden viele Reaktionen zum Modell hinzugefügt, die Transportprozessen oder Biosynthesewegen für Lipide und Kofaktoren zugerechnet werden können. Transportreaktionen wurden unter anderem für die Hexose L-Fucose [181] und die Aminosäuren Alanin, Arginin, Asparagin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanine, Threonine und Tyrosin hinzugefügt [182]. Auch bezüglich des intrazellulären Aminosäurestoffwechsels wurden Fortschritte gemacht.

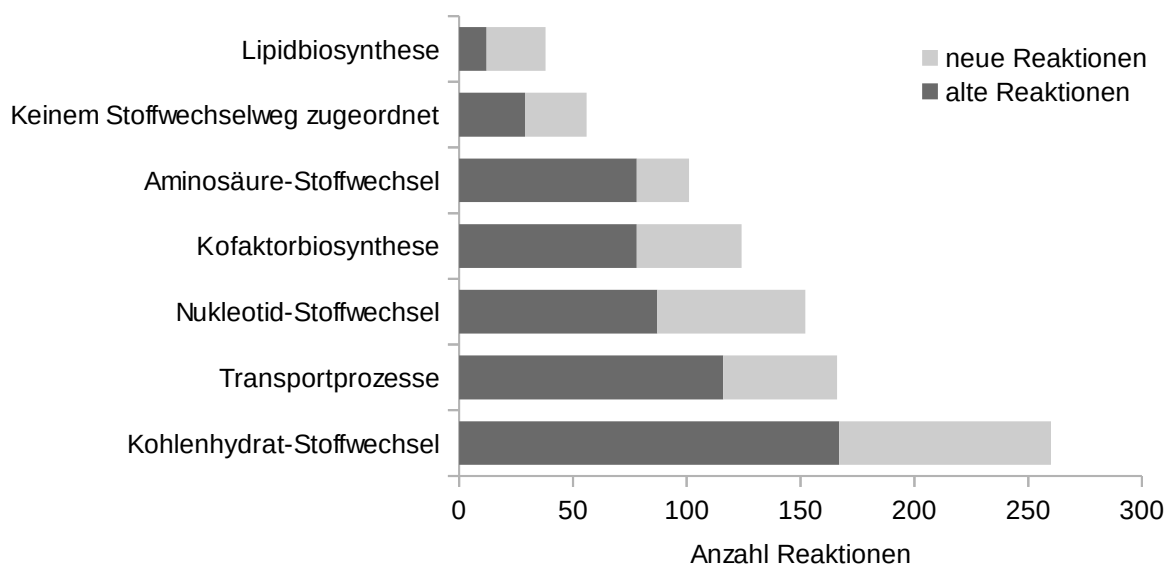


Abbildung 27: Einordnung der Reaktionen des metabolischen Modells von *S. solfataricus* P2 in Stoffwechselkategorien.

Dargestellt sind die bereits im Modell von Ulas (2012) vorhandenen und die seitdem neu hinzugefügten Reaktionen.

Darüber hinaus wurden folgende Stoffwechselwege bzw. Reaktionen zum Modell hinzugefügt:

- Intra- und extrazelluläre Protonierungsreaktionen für organische Säuren,
- Die extrazelluläre Degradation von Polysacchariden [183–185],

- Ein Biosyntheseweg für Carotinoide [186],
- Ein mit Hilfe dieses Modells postulierter Abbauweg für L-Fucose [181],
- Oxidative Stickland-Reaktionen, die mit dem Abbau mehrerer Aminosäuren assoziiert sind [182],
- Die Synthese der für *S. solfataricus* beschriebenen Tetraether-Lipide (inklusive der Biosynthese von Calditol) [187–189]

Außerdem wurden alle noch verbliebenen Vorkommen von Ubichinon im Modell durch die für *Sulfolobus* üblichen Verbindungen Caldariellachinon und Sulfolobuschinon ersetzt [190,191]. Die Biosynthesewege für Asparagin und Lysin wurden ebenfalls verändert, da es Hinweise darauf gibt, dass diese Biosynthesewege in *S. solfataricus* – analog zu denen aus *T. thermophilus* – tRNA-abhängig sind [192,193].

Wie auch das metabolische Modell von *T. thermophilus* konnte das Modell von *S. solfataricus* P2 an experimentelle Ergebnisse der Arbeitsgruppe angepasst und validiert werden. Hierunter fallen sowohl Biomassezusammensetzungen für das Wachstum auf den Kohlenstoffquellen Glucose, L-Fucose, Phenol und Caseinhydrolysat als auch Substrataufnahme- und Wachstumsraten für die Kohlenstoffquellen Glucose, D- und L-Arabinose, L-Fucose, Mannose, Lactose, Acetoin, Phenol und Caseinhydrolysat. Die Substrataufnahmeraten wurden in das Modell integriert und die NGAM für die entsprechenden Szenarien an die experimentell ermittelten Wachstumsraten angepasst (Kapitel 3.2.2). Aufgrund der experimentellen Ergebnisse konnte zudem die Biomassereaktion für das Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle aktualisiert werden (Tabelle 16). Die bisherige Biomassezusammensetzung wurde zum Großteil von dem Organismus *Methanosarcina barkeri* übernommen [92,194], wodurch der Anteil von RNA an der Biomasse deutlich überschätzt wurde. Noch fehlende Anteile der Biomasse konnten durch Glykogen ersetzt werden, da gezeigt wurde, dass *S. solfataricus* Glykogen nur unter optimalen Wachstumsbedingungen in der logarithmischen Wachstumsphase produziert und dieses, je nach Substrat, bis zu 30 % der Biotrockenmasse ausmachen kann [195,196]. Durch die experimentelle Bestimmung der Biomasseanteile von DNA, RNA und Proteinen beim Wachstum

von *S. solfataricus* P2 auf den Kohlenstoffquellen L-Fucose [181], Caseinhydrolysat [182] und Phenol (Jacqueline Wolf, persönliche Mitteilung, 2015) konnten außerdem drei zusätzliche Biomassereaktionen für das Wachstum auf diesen Substraten in das Modell integriert werden (Tabelle 17). Als einzige Ausnahme musste die neue Biomassereaktion für das modellierte Wachstum auf Phenol normalisiert werden, da sich durch den deutlich geringeren Anteil von Proteinen an der Biotrockenmasse die Biomassekomponenten nicht mehr auf 100% bzw. 1 g Biotrockenmasse aufsummieren.

Tabelle 16: Biomassezusammensetzung im Modell von *S. solfataricus* P2 für das Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Komponente	Biomasse-Anteil [%]		Aktuelle Referenz
	Ulas (2012)	Diese Arbeit	
DNA	4,00	1,07	[181]
RNA	24,00	5,37	[181]
Proteine	63,00	64,26	[181]
Lipide	5,00	7,50	[188]
Löslicher Pool	4,00	4,00	[194,197]
Glykogen	0,00	17,80	[195,196]

Tabelle 17: Biomasseanteile von DNA, RNA und Proteine für das Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf L-Fucose, Caseinhydrolysat oder Phenol als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Ausgehend von der Biomassezusammensetzung von *S. solfataricus* für das Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle konnten anhand der relativen Anteile der Biomassefraktionen DNA, RNA und Proteine neue Biomassereaktionen für das Wachstum auf Phenol, L-Fucose und Caseinhydrolysat erstellt werden. Nicht aufgeführte Biomassefraktionen sind unverändert gegenüber der Biomassezusammensetzung auf Glucose. Alle Biomassereaktionen werden auf 1g Biotrockenmasse normalisiert.

Substrat	Biomasse-Anteil der Komponente [%]			Referenz
	DNA	RNA	Proteine	
L-Fucose	1,16	5,59	67,93	[181]
Caseinhydrolysat	1,24	2,42	70,72	[182]
Phenol	1,22	4,23	46,99	J. Wolf (2015)

Das metabolische Modell von *S. solfataricus* konnte im Rahmen dieser Arbeit derart erweitert werden, dass es nun als das zweitgrößte Modell eines thermophilen Prokaryoten gilt. Das umfangreichste Modell eines thermophilen Prokaryoten ist das in dieser Arbeit vorgestellte Modell von *T. thermophilus* (Kapitel 3.2). Weiterhin wurden in das aktuelle Modell von *S. solfataricus* drei neue Biomassereaktionen für das Wachstum auf den alleinigen Kohlenstoffquellen L-Fucose, Phenol und Caseinhydrolysat implementiert, sodass Vorhersagen für das Wachstum des Organismus auf diesen Substraten nun deutlich höhere Genauigkeiten erzielen. Gleichzeitig wird die Validierung des Modells für diese Substrate vereinfacht, da in diesen Fällen weniger unbekannte Variablen existieren.

3.3.2 Charakterisierung des Stoffwechsels für verschiedene Kohlenstoffquellen

Das metabolische Modell von *S. solfataricus* P2 konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand experimenteller Ergebnisse optimiert und auf dieser Grundlage ebenfalls verifiziert werden (Tabelle 18). Basierend auf spezifischen Simulationen wird in den folgenden Kapiteln der Stoffwechsel des Organismus für das Wachstum auf unterschiedlichen Substraten detailliert charakterisiert. In diesem Zusammenhang wird insbesondere das Wachstum von *S. solfataricus* auf den Substraten L-Fucose und Caseinhydrolysat erstmals *in silico* beschrieben. In das Modell konnten Substrataufnahmeraten und Wachstumsraten für die Kohlenstoffquellen Glucose, Mannose, Lactose, D- und L-Arabinose, L-Fucose, Acetoin, Phenol sowie Caseinhydrolysat integriert werden. Zudem war – außer für die Substrate Acetoin, Phenol und Caseinhydrolysat – auch die experimentell ermittelte Integration von Kohlenstoff aus den Kohlenstoffquellen (Kohlenstoffbilanz) verfügbar.

Der Vergleich der Modellierungsergebnisse mit den experimentellen Daten zeigt, dass das Modell nun für alle untersuchten Substrate Biomasseflüsse vorhersagt, die deutlich näher an den experimentell beobachteten Wachstumsraten liegen als dies im Ausgangsmodell der Fall war [118]. Im Ausgangsmodell musste für den Vergleich des Wachstums auf verschiedenen Substraten immer von einer äquivalenten Aufnahme an Kohlenstoff ausgegangen werden, da keine Substrataufnahmeraten verfügbar waren (Anhang 6). Die neuen Substrataufnahmeraten, Biomassezusammensetzungen und angepassten Energieparameter erlauben nun zuverlässige Vorhersagen für alle in dieser Arbeit untersuchten Substrate. Die relativen Abweichungen gegenüber den experimentellen Wachstumsraten liegen dabei für alle Substrate außer L-Arabinose unter 15 %. Das Wachstum auf L-Arabinose wird vom Modell überschätzt. Anstelle der relativen Wachstumsrate von 80 % berechnet das Modell für dieses Substrat eine relative Wachstumsrate von 139 %. Dieser große Unterschied ist vermutlich auf eine überschätzte experimentelle

Tabelle 18: Vergleich von Modellvorhersagen mit zur Verfügung gestellten experimentellen Daten bezüglich des Wachstums von *S. solfataricus* P2 auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Das Wachstumsverhalten von *S. solfataricus* P2 wurde für verschiedene Kohlenstoffquellen untersucht (Jacqueline Wolf, persönliche Mitteilung, 2015) [181,182]. Gelistet sind die Integration von Kohlenstoff aus den Kohlenstoffquellen in die Biotrockenmasse (Kohlenstoffbilanz), Substrataufnahmeraten und spezifische Wachstumsraten während der logarithmischen Wachstumsphase. Gegenübergestellt sind die Modellvorhersagen für Wachstumsraten (Biomasseflüsse) und Kohlenstoffbilanzen. Ebenfalls aufgeführt sind die angepassten Werte für die wachstumsunabhängigen Energiekosten (NGAM) im Modell. Die NGAM wurden an Kohlenstoffbilanzen angepasst, anderenfalls an experimentelle Wachstumsraten. Nicht angepasste, sondern vorhergesagte Werte sind dunkelblau unterlegt.

Substrat	Experimentelle Ergebnisse				Modellierung				
	Substrat- aufnahme- rate [mmol · g _{BTM} ⁻¹ · h ⁻¹]	Spezifische Wachstumsrate [h ⁻¹] / [%] ¹	Kohlenstoff- Einbau ² [%]		Biomassefluss [h ⁻¹] / [%] ³		Kohlenstoff- bilanz ² [%]	NGAM [mmol · g _{BTM} ⁻¹ · h ⁻¹]	GAM [mmol · g _{BTM} ⁻¹]
D-Arabinose	1,31	0,053 118%	32,2		0,046 105%		32,2	5,74	27,3*
D-Glucose	0,72	0,045 100%	46,5		0,044 100%		46,5	2,14	27,3
D-Mannose	0,65	0,044 98%	45,4		0,038 84%		45,4	0,96	27,3*
L-Fucose ⁴	0,83	0,040 89%	39,8		0,043 98%		39,8	3,87	27,9
L-Arabinose	1,42	0,036 80%	39,7		0,061 138%		39,7	4,61	27,3*
Lactose	0,27	0,034 76%	40,9		0,029 64%		40,9	2,53	27,3*
Acetoin	1,64	0,029 64%	-		0,029 64%		20,3	11,09	27,3*
Phenol	0,81	0,015 33%	-		0,015 33%		14,0	5,45	24,9
Caseinhydrolysat	†	0,030 67%	-		0,030 67%		57,7	0,74	29,9

¹ Relative Wachstumsrate gegenüber dem Wachstum auf Glucose.

² (Vorhergesagter) Anteil des Kohlenstoffs aus der Kohlenstoffquelle, der in die Biomasse eingeht.

³ Relativer Biomassefluss gegenüber dem modellierten Wachstum auf Glucose.

⁴ In den Spalten der Modellierungsergebnisse sind die Werte für das Szenario des mit Hilfe dieser Arbeit postulierten L-Fucose-Abbauwegs gezeigt.

* Die Biomassezusammensetzung und GAM wurden aus dem Glucose-Szenario übernommen.

† Die Aufnahmeraten der einzelnen Aminosäuren des Caseinhydrolysats sind an anderer Stelle aufgeschlüsselt.

Substrataufnahmerate oder Kohlenstoffbilanz zurückzuführen. Dies ist darin begründet, dass die endgültige Verteilung des Kohlenstoffs im Modell durch die Substrataufnahmerate, den Kohlenstoffgehalt der Biomasse und die Kohlenstoffbilanz bestimmt wird. Als einziger dieser Parameter wurde die Biomassezusammensetzung für das Wachstum auf L-Arabinose nicht experimentell ermittelt. In mesophilen Organismen beträgt der Anteil von Kohlenstoff an der Biotrockenmasse etwa 47 – 50 % [141,198]. Im metabolischen Modell von *S. solfataricus* liegt dieser Anteil für das Wachstum auf den Substraten Glucose, Caseinhydrolysat und Phenol zwischen 52 – 53 %. Der Kohlenstoffgehalt der Biomasse beim Wachstum auf L-Arabinose müsste stark von diesen Werten abweichen und unter 30 % liegen, um die experimentelle Wachstumsrate zu reproduzieren. Ein solch niedriger Anteil von Kohlenstoff an der Biomasse wurde für Mikroorganismen bisher nicht beschrieben ist. Eher wahrscheinlich ist, dass die experimentell beobachtete Substrataufnahmerate und Kohlenstoffbilanz zu hoch sind und daher neu bestimmt werden sollten.

Im Folgenden wird das modellierte Wachstum auf Glucose als Referenz verwendet, um das *in silico* Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf den Kohlenstoffquellen Mannose, Lactose, D- und L-Arabinose, L-Fucose, Acetoin sowie Caseinhydrolysat erstmals zu charakterisieren. Das *in silico* Wachstum von *S. solfataricus* auf Glucose und Phenol wurde bereits beschrieben [118]. Da das Wachstum auf Glucose allerdings als Referenz verwendet wird und zum damaligen Zeitpunkt für die entsprechenden Simulationen kaum experimentelle Daten in das Modell integriert werden konnten, sollen diese Ergebnisse ebenfalls dargestellt werden.

3.3.2.1 Glucose, Lactose und Mannose

Das *in silico* Wachstum von *S. solfataricus* auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle wurde 2012 erstmals modelliert [92,118]. Da dem Organismus das Enzym Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) fehlt, kann keine klassische Glykolyse stattfinden [199]. Die Monosaccharide Glucose und Galactose werden stattdessen in *S. solfataricus* über den verzweigten Entner-Doudoroff-Weg zu Pyruvat und anschließend über eine Ferredoxin-abhängige Pyruvat-Synthase (EC 1.2.7.1) zu Acetyl-CoA verstoffwechselt [200–203] (Abbildung 28). Hierbei stellt die 2-Keto-3-deoxygluconat-Aldolase (KD(P)G Aldolase, EC 4.1.2.55) den Verzweigungspunkt zwischen semi-phosphorylierendem und nicht-phosphorylierendem Entner-Doudoroff-Weg dar (**spED** / **npED**). Über den spED wird 2-Keto-3-deoxyphosphogluconat (KDPG) bzw. 2-Keto-3-deoxyphosphogalactonat (KDPGal) zu Glyceraldehyd-3-phosphat und Pyruvat gespalten, während über den npED 2-Keto-3-deoxygluconat (KDG) bzw. 2-Keto-3-deoxyphosphogalactonat (KDGal) zu Pyruvat und Glyceraldehyd gespalten wird [204–207]. Es wird vermutet, dass der spED für die Gluconeogenese relevant ist, da über diesen Weg Glyceraldehyd-3-phosphat gebildet wird [208].

Die Aufnahme von Glucose und Mannose erfolgt in *S. solfataricus* über einen gemeinsamen ABC-Transporter [209,210]. Der Mechanismus der Aufnahme von Lactose ist hingegen nicht bekannt. In dieser Arbeit wird davon ausgegangen, dass die Aufnahme von Lactose – wie die der meisten Zucker und Polysaccharide in *S. solfataricus* – aktiv unter ATP-Verbrauch stattfindet. Lactose kann in *S. solfataricus* über eine β -Glycosidase zu Glucose und Galactose gespalten werden [211,212]. Mannose wird hingegen wahrscheinlich über eine Hexokinase (HK) phosphoryliert und dann über eine Phosphohexose-Isomerase (PGI) zu Fructose-6-phosphat umgewandelt. Die Hexokinase aus *S. solfataricus* ist noch nicht charakterisiert worden, allerdings konnte Hexokinase-Aktivität in Zellextrakten des Organismus nachgewiesen werden [213] und das Enzym ist im nahe verwandten Organismus *S. tokodaii* präsent [214].

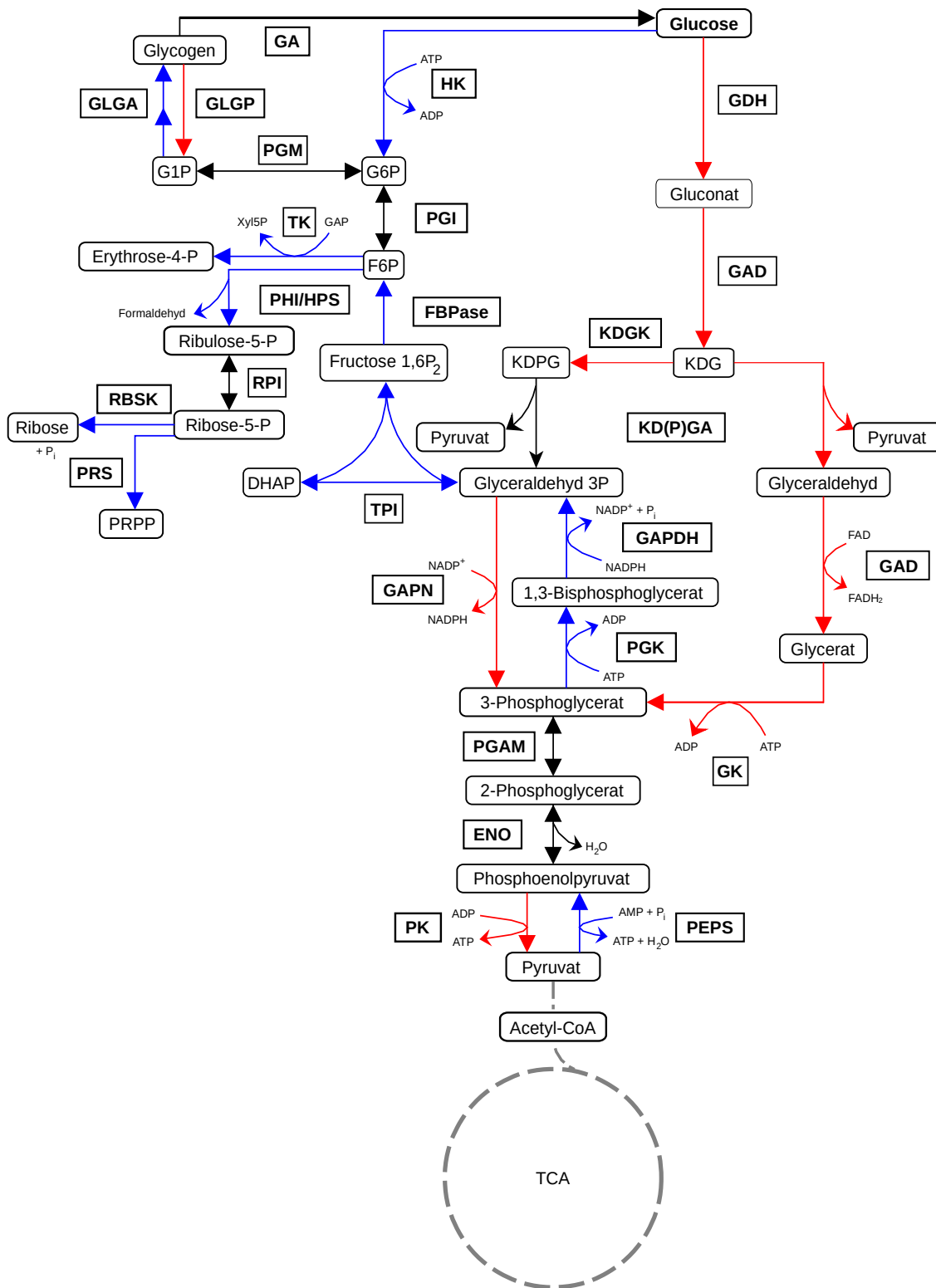


Abbildung 28: Übersicht über den Zentralstoffwechsel von *S. solfataricus* P2 für das Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Anabole Reaktionen sind blau und katabole Reaktionen rot gekennzeichnet. Abkürzungen sind im Anhang aufgelistet. (Abbildung teilweise angefertigt nach [118,208]).

Glucose

Für die Modellierung des Wachstums von *S. solfataricus* auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle konnten in dieser Arbeit gegenüber dem Ausgangsmodell [118] neue experimentelle Daten in das Modell integriert werden. Die durchschnittliche Glucoseaufnahmerate während der logarithmischen Wachstumsphase beträgt nach neueren Messungen demnach $0,72 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ anstelle des bisher verwendeten Wertes von $0,55 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ [181]. Zudem wurde das Modell an die experimentell ermittelte Kohlenstoffbilanz von 47 % angepasst und es konnte eine für das Wachstum auf Glucose spezifische Biomassezusammensetzung ermittelt werden. Für das Ausgangsmodell wurde noch eine Kohlenstoffbilanz von 25 % angenommen. Im Folgenden wird das Ausgangsmodell als Referenz verwendet und mit den Flüssen im aktuellen Modell für das modellierte Wachstum auf Glucose verglichen. Eine Auflistung aller im metabolischen Modell von *S. solfataricus* P2 verwendeten Stoffwechselweg-Abkürzungen findet sich im Anhang (Anhang 4).

Die vom aktuellen Modell vorhergesagte Wachstumsrate entspricht mit $0,044 \text{ h}^{-1}$ nun deutlich besser der experimentell gemessenen Wachstumsrate von $0,045 \text{ h}^{-1}$, als dies im Ausgangsmodell der Fall war (Referenz: $0,022 \text{ h}^{-1}$). Bei der Betrachtung der Kohlenstoffflüsse im aktuellen Modell (Abbildung 29) ergeben sich weitere qualitative und quantitative Unterschiede zu den Vorhersagen des Ausgangsmodells. Während im Ausgangsmodell 22 % des Kohlenstoffs in den spED eingehen, sind es im aktuellen Modell 85 %. Der npED ist daher nur mit einem sehr geringen Fluss aktiv. Der Fluss durch den spED bedient nicht wie im Ausgangsmodell hauptsächlich anabole Stoffwechselwege, wie den nicht-oxidativen Pentosephosphatweg, die Gluconeogenese und den reversen Ribulosemonophosphatweg. Letzter Stoffwechselweg übernimmt in *S. solfataricus* die Rolle des oxidativen Pentosephosphatwegs [215]. Das für diese Wege benötigte Fructose-6-phosphat (13 % des aufgenommenen Kohlenstoffs) wird stattdessen vollständig über eine Hexokinase produziert. Dieses Enzym ist sehr

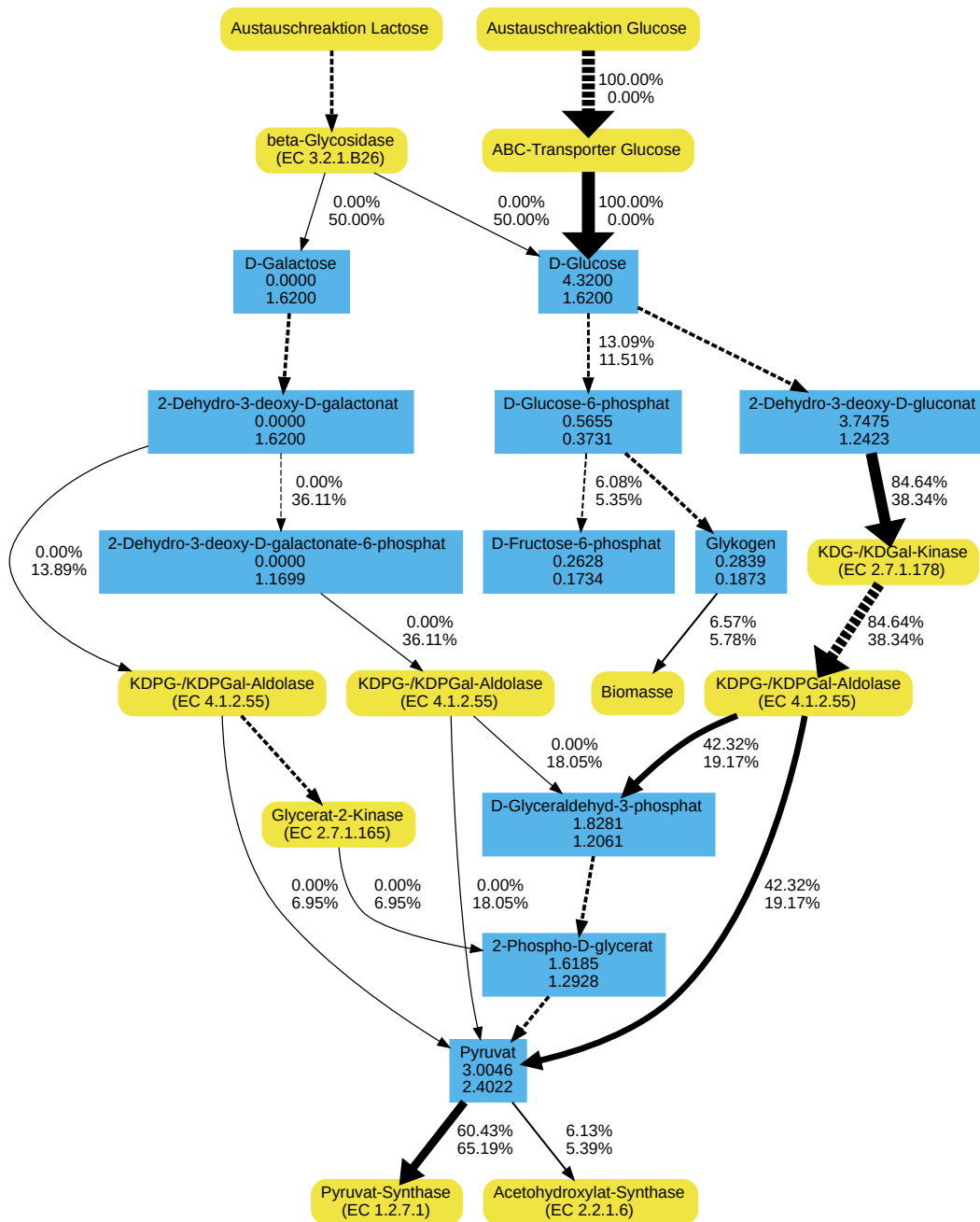


Abbildung 29: Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse im verzweigten Entner-Doudoroff-Weg von *S. solfataricus* P2 für das Wachstum auf Glucose und Lactose als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Kohlenstoffflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in $\text{mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Kohlenstoffflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Kohlenstoff, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 5 % werden nicht angezeigt. Obere Zahlen geben die Werte für das simulierte Wachstum auf Glucose an und untere Zahlen die Werte für das simulierte Wachstum auf Lactose.

wahrscheinlich relevant für die Regulation zwischen anaboler Gluconeogenese und katabolem Entner-Doudoroff-Weg [208] und war im Ausgangsmodell noch nicht integriert. Im aktuellen Modell wird der spED stattdessen ausschließlich für katabole Zwecke verwendet. Die beiden Zweige des verzweigten Entner-Doudoroff-Wegs unterscheiden sich letztlich in zwei wichtigen Punkten. Erstens wird über den spED Glyceraldehyd-3-phosphat produziert, welches direkt für die Gluconeogenese verwendet werden kann, und zweitens werden in den beiden Zweigen des Entner-Doudoroff-Wegs beim vollständigen Abbau der Glucose zu Pyruvat unterschiedliche Reduktionsäquivalente regeneriert. Während im spED über die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPN) NADPH gebildet wird [216], werden im npED des Entner-Doudoroff-Wegs über die Glyceraldehyd-Dehydrogenase (GAD) FADH_2 oder reduzierte Ferredoxine regeneriert [217,218]. Der genaue Elektronenakzeptor ist noch nicht bekannt, aber beide Verbindungen können zur Regeneration von NADH oder im Falle des Ferredoxins auch direkt als Elektronendonatoren in der Atmungskette verwendet werden. Die unterschiedliche Relevanz des spED gegenüber dem Ausgangsmodell ist auch aus Split-ratio Analysen des Metaboliten NADPH ersichtlich (Tabelle 19), da etwa 98 % des NADPH im spED produziert werden. Die Bedeutung des spED für die Gluconeogenese tritt daher im aktuellen Modell in den Hintergrund, vielmehr wird primär NADPH regeneriert. Dies bestätigt die Beobachtung, dass der spED nicht essentiell für das Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf Glucose ist, da Mutanten ohne diesen Zweig keine Wachstumsbeschränkungen auf Glucose aufweisen [213]. Tatsächlich ist die Produktion von Fructose-6-phosphat aus Glucose über den spED auch energetisch ungünstiger als die direkte Phosphorylierung und Isomerisierung der Glucose. Solange die Hexokinase im metabolischen Netzwerk von *S. solfataricus* aktiv werden kann, wird der spED beim Wachstum auf Glucose daher nur eine untergeordnete Relevanz für die Gluconeogenese besitzen.

Anhand der optimalen FVA können die Reaktionen identifiziert werden, die für einen optimalen Biomassefluss essentiell sind. Daraus ist ersichtlich, dass auch der npED beim Wachstum auf Glucose im aktuellen Modell einen hohen Fluss tragen kann (etwa 96 % des Flusses des spED). Deaktiviert man den spED im

Modell vollständig, wird NADPH hauptsächlich im Citratzyklus durch eine Isocitrat-Dehydrogenase mit dualer Kofaktor-Spezifität [219] regeneriert und der Biomassefluss sinkt geringfügig auf 99,6 % des Optimums. Es wird also geringfügig mehr NADPH benötigt, als der Fluss durch den Citratzyklus im optimalen Szenario ohnehin produzieren würde, sodass ohne den spED ein etwas höherer Fluss im Citratzyklus und damit eine höhere CO₂-Produktion vorhergesagt werden müssen. Letztlich zeigt das metabolische Netzwerk von *S. solfataricus* beim Wachstum auf Glucose als Kohlenstoffquelle eine relativ hohe Variabilität bzw. Freiheit bei der Verwendung der beiden Zweige des Entner-Doudoroff-Wegs, auch wenn ein geringer Fluss durch den spED offenbar essentiell für einen optimalen Biomassefluss ist.

Bereits im Ausgangsmodell musste behelfsmäßig der Export von Sedoheptulose-7-phosphat (7 C-Atome) erlaubt werden, da *S. solfataricus* einen unvollständigen Pentosephosphatweg ohne Transaldolase besitzt [215] und keine Möglichkeit bekannt ist, diese Lücke zu schließen. Diese Lücke konnte noch nicht geschlossen werden, allerdings ist im aktuellen Modell stattdessen der äquimolare Export von Xylulose-5-phosphat (5 C-Atome) möglich, wodurch letztlich der artifizielle Kohlenstoffverlust vermindert wird (Abbildung 28, TK). Dieser beträgt beim modellierten Wachstum auf Glucose nur etwa 3 % des aufgenommenen Kohlenstoffs.

Lactose

Nach der Spaltung von Lactose durch eine β -Glycosidase in Glucose und Galactose können beide Monosaccharide in *S. solfataricus* über den Entner-Doudoroff-Weg verstoffwechselt werden. Da beim Wachstum auf Lactose intrazelluläre Glucose verfügbar ist, werden zum Großteil ähnliche Modellvorhersagen wie für das modellierte Wachstum auf Glucose erwartet. Die vom Modell für das Wachstum auf Lactose vorhergesagte Wachstumsrate wurde vom Ausgangsmodell höher eingeschätzt als die Wachstumsrate auf Glucose, was inzwischen allerdings durch experimentelle Ergebnisse widerlegt wurde. Die relative Wachstumsrate im Vergleich zu Glucose beträgt etwa 76 %. Dieser Phänotyp wird vom aktuellen Modell nun deutlich besser reproduziert (Tabelle 18).

Aus den vom Modell vorhergesagten Kohlenstoffflüssen (Abbildung 29) ist ersichtlich, dass die Glucose, wie auch beim modellierten Wachstum auf Glucose, nahezu vollständig zu Fructose-6-phosphat umgewandelt (12 % des Kohlenstoffs) und im spED abgebaut wird (38 % des Kohlenstoffs). Die Galactose wird hingegen sowohl im spED (34 % des Kohlenstoffs) als auch im npED abgebaut (14 % des Kohlenstoffs). Die Split-ratio Analysen der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das Wachstum auf Lactose gleichen sich im Prinzip denen für Glucose, außer dass Teile des ATP für die Verstoffwechselung der Galactose im Entner-Doudoroff-Weg benötigt und darüber wiederum auch gewisse Anteile des NADH generiert werden. Aus den Split-ratio Analysen des Metaboliten NADPH ist ersichtlich, dass der niedrigere Fluss durch den spED im Vergleich zum Glucose-Szenario dennoch ausreicht, um 98 % des NADPH zu generieren. Laut optimaler FVA ist beim Wachstum auf Lactose wie beim Wachstum auf Glucose zudem ebenfalls ein gewisser Mindestfluss durch den spED nötig, unabhängig ob dieser ausgehend von Gluconat oder Galactonat erfolgt. Anderenfalls sinkt der Biomassefluss ebenfalls auf etwa 99,6 %. Diese Beobachtung deckt sich mit der oben beschriebenen Tatsache, dass Mutanten ohne spED keine merkbaren Wachstumseinschränkungen auf Glucose aufweisen.

Mannose

Mannose kann in *S. solfataricus* über eine Hexokinase (HK) phosphoryliert und dann über eine Phosphohexose-Isomerase (PGI) zu Fructose-6-phosphat umgewandelt werden. In vielen Organismen kann dieser Metabolit über die Glykolyse abgebaut werden. In *S. solfataricus* fehlt jedoch das Enzym Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) für die Umwandlung des Fructose-6-phosphats zu Fructose-1,6-bisphosphat, welches wiederum in Dihydroxyacetonphosphat und Glyceraldehyd-3-phosphat gespalten werden könnte. Daher kann Mannose in *S. solfataricus* nicht über diesen Stoffwechselweg abgebaut werden. Stattdessen wird die Mannose im Modell zu Glucose umgewandelt, um diese dann im Entner-Doudoroff-Weg zu verstoffwechseln.

Wie auch die Wachstumsrate für das modellierte Wachstum auf Lactose wurde die Wachstumsrate für Mannose vom Ausgangsmodell noch überschätzt. Verglichen mit dem Wachstum auf Glucose sind die Substrataufnahmeraten und tatsächlichen Wachstumsraten aber annähernd identisch. Im aktuellen Modell von *S. solfataricus* P2 wird die Wachstumsrate leicht unterschätzt (Tabelle 18). Wie vorher diskutiert wird die endgültige Verteilung von Kohlenstoff im Modell durch die Substrataufnahmerate, den Kohlenstoffgehalt der Biomasse und die Kohlenstoffbilanz vorgegeben (Kapitel 3.3.2). Sind diese drei Parameter festgelegt, wie es beim modellierten Wachstum auf Glucose, Mannose und Lactose der Fall ist, so kann nur eine einzige resultierende Wachstumsrate vorhergesagt werden. Die einzigen Variablen stellen dann die Energieparameter, in diesem Fall die NGAM, sowie die Flüsse innerhalb des Modells dar. Da die Substrataufnahmerate und die Kohlenstoffbilanz für das Wachstum auf Mannose geringer ausfallen als beim Wachstum auf Glucose und dieselbe Biomassezusammensetzung verwendet wird, kann das Modell folglich nur eine niedrigere Wachstumsrate vorhersagen. Es ist denkbar, dass sich die Biomassezusammensetzung beim Wachstum auf Mannose gegenüber der Referenz unterscheidet, und somit der Kohlenstoffanteil der Biomasse höher ist. Da der Kohlenstoffanteil an der Biomasse jedoch auf verschiedensten Substraten

Aus der Betrachtung der Kohlenstoffflüsse beim modellierten Wachstum auf Mannose (Abbildung 30) ist ersichtlich, dass die Mannose im Modell über Glucose-6-phosphat zu Glykogen und anschließend Trehalose aufgebaut wird. Die Trehalose kann dann wiederum in Glucose-Monomere gespalten und diese im Entner-Doudoroff-Weg abgebaut werden. Für die intrazelluläre Umwandlung von einem Molekül Mannose zu Glucose werden über diesen Weg zwei Moleküle ATP verbraucht. Auf dem Weg zur Umwandlung der Mannose zu Glucose werden je etwa 6 % des Kohlenstoffs als Fructose-6-phosphat und Glykogen für anabole Zwecke und die Biomassereaktion abgeführt. Die verbleibenden etwa 87 % des

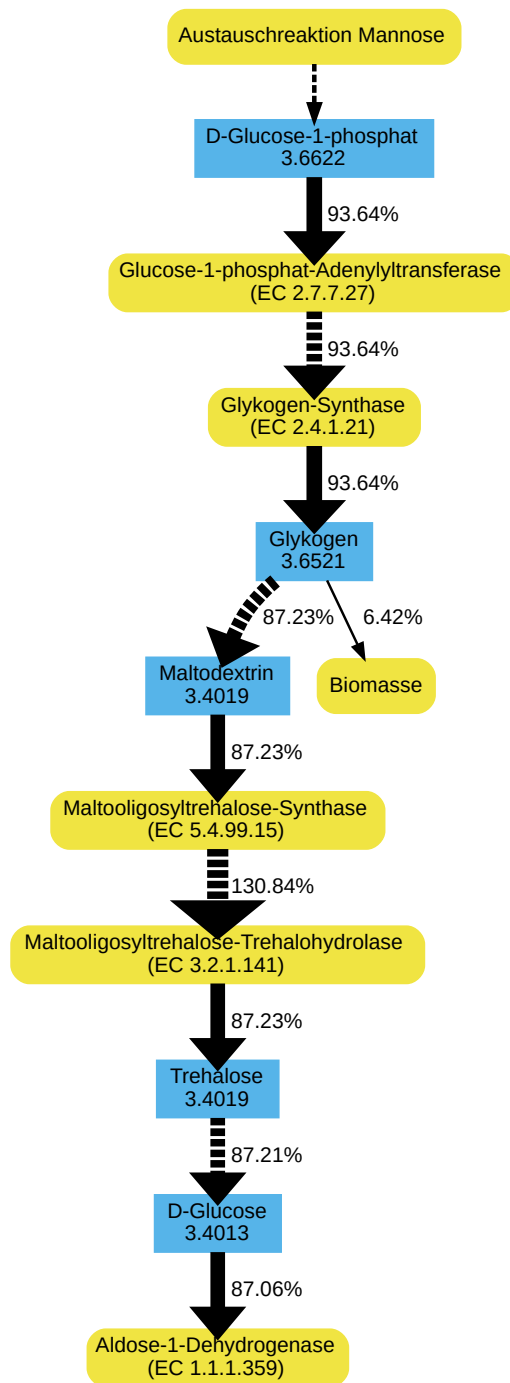


Abbildung 30: Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse in *S. solfataricus* P2 für das Wachstum auf Mannose als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Kohlenstoffflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in $\text{mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Kohlenstoffflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Kohlenstoff, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 5 % werden nicht angezeigt.

Kohlenstoffs werden in Form von Glucose im npED zu Pyruvat abgebaut. Als effizientere Alternative zu diesem Weg wäre auch die Hydrolyse des Glucose-6-phosphats zu Glucose und freiem Phosphat denkbar, da hierbei für die Umwandlung von Mannose zu Glucose nur ein Molekül ATP pro Molekül Mannose benötigt wird. Bei der Modellierung eines solchen Szenarios steigt die vorhergesagte Wachstumsrate noch einmal um weitere 10 %. Allerdings ist die spontane Hydrolyse von Glucose-6-phosphat – selbst bei 80 °C – zu langsam, um eine mit dem Wachstum auf Glucose vergleichbare Wachstumsrate zu ermöglichen, da Hexosephosphate wie Fructose-6-phosphat relativ thermostabil sind [220]. Weiterhin sind im Genom von *S. solfataricus* P2 keine Enzyme kodiert, die diese Reaktion katalysieren würden, wie z.B. eine Glucose-6-Phosphatase (EC 3.1.3.9) oder Zucker-Phosphatase (EC 3.1.3.58).

Aus den Split-ratio Analysen der Metaboliten ATP, NADH und NADPH für das modellierte Wachstum auf Mannose und Glucose (Tabelle 19) ist zu erkennen, dass es nur wenige Unterschiede in den produzierenden und verbrauchenden Reaktionen dieser Metabolite gibt. Anders als im Glucose-Szenario werden im Mannose-Szenario 12 % des ATP für die Synthese von Glykogen benötigt und der ATP-Verbrauch im Rahmen des Entner-Doudoroff-Wegs findet nun im npED durch die Glycerat-Kinase (GK) statt. Dementsprechend wird auch mehr NADH im npED produziert. NADPH wird beim modellierten Wachstum auf Mannose nahezu vollständig im Citratzyklus über die oben erwähnte Isocitrat-Dehydrogenase mit dualer Kofaktor-Spezifität produziert. Laut optimaler FVA ist dieser Fluss jedoch nicht essentiell, da NADPH auch über den spED produziert werden kann. Das in diesem Szenario ein Fluss durch die NADPH produzierende Reaktion der Isocitrat-Dehydrogenase vorhergesagt wird, ist auf den extremen Algorithmus der FBA zurückzuführen. Bei Verwendung der FBA werden Flüsse zwischen gleichwertigen Reaktions-Alternativen niemals aufgespalten, sondern es wird immer eine extreme Lösung ermittelt.

Tabelle 19: Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf Glucose, Lactose und Mannose als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Die Gesamtflüsse der jeweiligen Metabolite betragen für Glucose, Lactose und Mannose 5,3444 / 4,4835 / 4,9454 (ATP), 3,7094 / 3,0946 / 3,4201 (NADH) und 0,5953 / 0,3927 / 0,5247 (NADPH) $\text{mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Aufgelistet sind die relativen Anteile spezifischer Metabolit produzierender und verbrauchender Reaktionen. Relative Flüsse kleiner als 4 % (ATP und NADH) bzw. 10 % (NADPH) sind nicht aufgelistet.

Reaktion / Enzym	EC-Nr.	Stoffwechselweg	Anteil in Szenario		
			Glucose	Lactose	Mannose
ATP – verbrauchend					
NGAM	-	Energiehaushalt	39,9%	56,0%	19,3%
GAM	-	Energiehaushalt	22,3%	17,5%	21,3%
ABC-Transporter (Substrat)	-	Transport	13,4%	6,0%	13,1%
KDG-/KDGal-Kinase (Glucose)	2.7.1.178	Entner-Doudoroff-Weg	11,3%	4,6%	0,0%
KDG-/KDGal-Kinase (Galactose)	2.7.1.178	Entner-Doudoroff-Weg	0,0%	4,3%	0,0%
Glucose-1-phosphat-Adenylyltransferase	2.7.7.27	Glykogen-Synthese	0,0%	0,0%	12,3%
Glycerat-2-Kinase	2.7.1.165	Entner-Doudoroff-Weg	0,0%	0,0%	10,9%
ATP – produzierend					
ATP-Synthase	3.6.3.14	Atmungskette	80,5%	80,4%	80,5%
Succinat-CoA-Ligase	6.2.1.5	Citratzyklus	12,0%	12,3%	12,1%
Pyruvat-Kinase	2.7.1.40	Entner-Doudoroff-Weg	7,3%	7,2%	7,3%
NADH – verbrauchend					
NADH-Chinon-Dehydrogenase	1.6.5.3	Atmungskette	98,8%	99,1%	98,9%
NADH – produzierend					
Ferredoxin-NADH-Reduktase	1.18.1.3	Redoxreaktionen	41,4%	41,1%	41,3%
Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.42	Citratzyklus	19,2%	19,3%	4,2%
Malat-Dehydrogenase (NADH)	1.1.1.40	Citratzyklus	18,1%	18,5%	18,2%
Aldose1-Dehydrogenase	1.1.1.359	Entner-Doudoroff-Weg	16,8%	6,7%	16,5%
Phosphoglycerat-Dehydrogenase	1.1.1.95	Aminosäuren	1,2%	0,0%	1,1%
Aldose1-Dehydrogenase	1.1.1.359	Entner-Doudoroff-Weg	0,0%	8,7%	0,0%
Flavin-Reduktase	1.5.1.36	Redoxreaktionen	0,0%	2,4%	15,8%
NADPH – verbrauchend					
Glutamat-Dehydrogenase (NADPH)	1.4.1.3	Aminosäuren	55,1%	55,1%	55,1%
Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase	1.1.1.34	Isoprenoid-Synthese	10,1%	10,1%	10,1%
NADPH – produzierend					
Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (NADPH)	1.2.1.9	Entner-Doudoroff-Weg	97,6%	97,6%	0,0%
Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.42	Citratzyklus	0,0%	0,0%	97,6%

3.3.2.2 Acetoin

Acetoin ist ein weit verbreitetes Stoffwechselprodukt vieler Mikroorganismen und auch Pflanzen. Es kann in *S. solfataricus* P2 durch einen aus zwei Untereinheiten bestehenden Acetoin-Dehydrogenase-Komplex (EC 2.3.1.190) in Acetaldehyd und Acetyl-CoA gespalten werden [91]. Das gebildete Acetaldehyd kann durch die Aktivität einer Aldehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.3) zu Acetat oxidiert und dieses durch die Aktivität einer Acetat-CoA-Ligase (EC 6.2.1.13) ebenfalls zu Acetyl-CoA verstoffwechselt werden. Für *S. solfataricus* ist bisher keine Aldehyd-Dehydrogenase charakterisiert worden, allerdings weisen zwei Proteine aus *S. solfataricus* P2 (Sso1629, Sso1842) über 99 % Identität zu der Aldehyd-Dehydrogenase aus *S. tokodaii* Stamm 7 [221] auf, sodass dieses Enzym in das metabolische Modell aufgenommen werden konnte. Pro Molekül Acetoin werden demnach in *S. solfataricus* P2 unter Verbrauch eines Moleküls ATP ein reduziertes Reduktionsäquivalent (NADH) sowie zwei Moleküle Acetyl-CoA gebildet.

Wachstumsrate

Die vom Modell für das Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf Acetoin als alleiniger Kohlenstoffquelle vorhergesagte Wachstumsrate wurde an die experimentellen Ergebnisse angepasst und stimmt daher mit diesen überein. Auf Grundlage der experimentellen Rahmendaten (Substrataufnahmerate, Wachstumsrate) kann das Modell jedoch auch die Kohlenstoffbilanz beim Wachstum auf Acetoin vorhersagen. Diese beträgt etwa 20 % und ist somit deutlich geringer als die experimentellen Kohlenstoffbilanzen für andere Substrate, die im Bereich von 32 – 47 % liegen (Tabelle 18). Daher ist das Wachstum auf Acetoin bezogen auf die Biomasseausbeute pro Gramm Substrat höchstwahrscheinlich ineffizienter als auf anderen Substraten. Es existiert jedoch auch die Möglichkeit dass die Kohlenstoffbilanz vom Modell unterschätzt wird. In diesem Fall müsste der Kohlenstoffgehalt der Biomasse beim Wachstum auf Acetoin deutlich höher ausfallen als dies beim Wachstum auf anderen Substraten der Fall ist.

Zentralstoffwechsel

Der in Form des Acetoin aufgenommene Kohlenstoff wird im Modell wie erwartet zu 100 % zu Acetyl-CoA verstoffwechselt (Abbildung 31). Etwa 85 % des Kohlenstoffs werden ausgehend von Acetyl-CoA über die Citrat-Synthase in den Citratzyklus eingeführt während etwa 12 % des Acetyl-CoA über den Glyoxylat-Shunt verstoffwechselt werden. Der Fluss durch den Citratzyklus im Modell ist extrem hoch. Etwa 73 % des gesamten Kohlenstoffs werden im Citratzyklus zu CO₂ abgebaut, was 91 % der gesamten CO₂-Produktion im Modell ausmacht. Die Bedeutung des Citratzyklus für den Energiestoffwechsel im Modell wird aus der Betrachtung von Split-ratio Analysen der Metabolite ATP, NADH und NADPH deutlich (Tabelle 20). Der Großteil (70 %) des für die oxidative Phosphorylierung benötigten NADH wird über den Citratzyklus durch die Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.40), die Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) und indirekt über die Ferredoxin-abhängige 2-Ketosäure-Oxidoreduktase (EC 1.2.7.11) produziert. Die übrigen 30 % des NADH werden zu gleichen Teilen bei der Oxidation des Acetoin und des daraus gebildeten Acetaldehyd gebildet. Interessanterweise wird auch das im Modell benötigte NADPH nahezu vollständig im Citratzyklus produziert, und zwar über eine NADP⁺-spezifische Reaktion der Malat-Dehydrogenase. Im metabolischen Modell von *S. solfataricus* P2 existieren zwei Reaktionen dieses Enzyms, je eine NAD⁺- und eine NADP⁺-spezifische Reaktion. Dies ist darin begründet, dass die Malat-Dehydrogenase des nahe verwandten Organismus *S. solfataricus* MT-4 eine duale Kofaktor-Spezifität besitzt [222] und dass die Pyridin-Nukleotid-abhängigen Dehydrogenasen aus Archaeen generell oft eine duale Kofaktor-Spezifität aufweisen [223,224]. Der Citratzyklus ist demnach im Modell in der Lage, sowohl den Bedarf an NADH und NADPH zu decken.

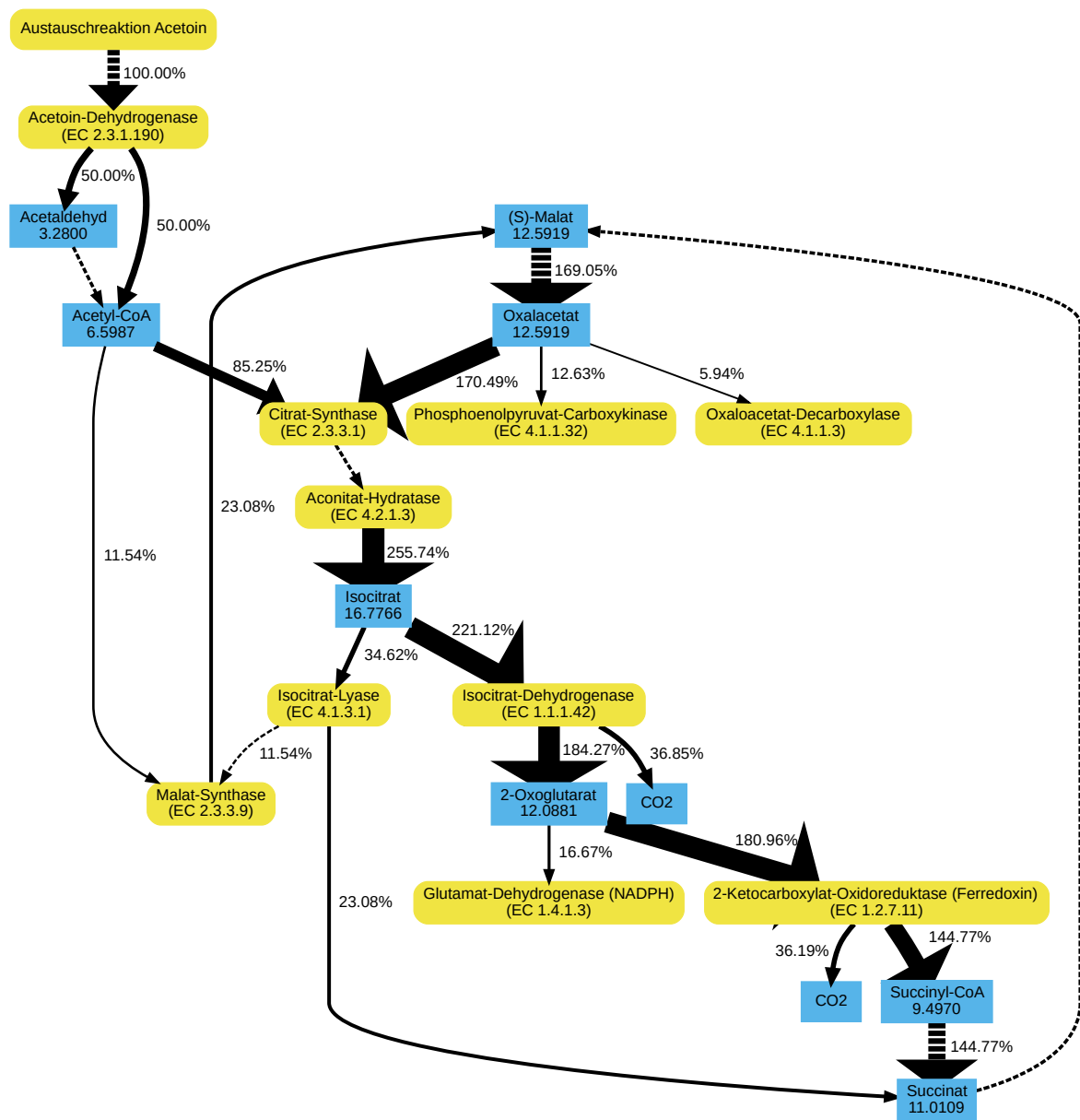


Abbildung 31: Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse in *S. solfataricus* P2 für das Wachstum auf Acetoin als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Kohlenstoffflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in $\text{mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Kohlenstoffflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Kohlenstoff, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 5 % werden nicht angezeigt.

Essentielle Metabolitflüsse und Variabilität im Modell

Anhand der suboptimalen MFM können diejenigen Metabolitflüsse identifiziert werden, die beim modellierten Wachstum auf Acetoin gegenüber dem Wachstum auf Glucose (im Folgenden Referenz) signifikant verändert sind (Abbildung 32). Insgesamt sind die minimalen Metabolitflüsse von 32 Metaboliten gegenüber der Referenz verändert. Vier dieser Metabolite sind nur im Glucose-Szenario essentiell, da sie im Acetoin-Szenario nicht zur Verfügung stehen (extrazelluläre Glucose) oder Intermediate des Glucose-abbauenden Entner-Doudoroff-Wegs sind (D-Gluconat, D-Glucono-1,5-Lacton, KDG). Auf der anderen Seite sind im Acetoin-Szenario 11 Metabolite essentiell, die in der Referenz nicht aktiv sein müssen. Hierzu gehören das Substrat Acetoin (intra- und extrazellulär), vier Intermediate des Citratzyklus (*cis*-Aconitat, Isocitrat, Succinat, Succinyl-CoA, Citrat), Glyoxylat sowie drei Intermediate der Gluconeogenese (2-Phospho-D-Glycerat, 1,3-Bisphospho-D-glycerat und Fructose-1,6-bisphosphat). Die Intermediate des Citratzyklus sind gegenüber der Referenz laut suboptimaler MFM essentiell, da erstens das aus Acetoin produzierte Acetyl-CoA nur über den Citratzyklus abgebaut werden kann und zweitens über den Glyoxylat-Shunt Intermediate des Citratzyklus produziert werden müssen. Andere Intermediate des Citratzyklus sind in beiden Szenarien essentiell, jedoch im Acetoin-Szenario ebenfalls signifikant erhöht (Malat, Fumarat, Oxalacetat, Ferredoxine). Der Glyoxylat-Shunt ist im Acetoin-Szenario essentiell, da ohne diesen Stoffwechselweg keine Vorläufermoleküle für die Biomasse aus dem Citratzyklus abgeführt werden könnten, sondern stattdessen Acetyl-CoA nur vollständig zu CO₂ abgebaut würde. Die Gluconeogenese ist im Acetoin-Szenario ebenfalls essentiell, was durch die erhöhten Mindestflüsse von Phosphoenolpyruvat, D-Glyceraldehyd-3-phosphat, 3-Phospho-D-glycerat und Dihydroxyacetonphosphat angezeigt wird. Weitere signifikant veränderte Mindestflüsse weisen die Intermediate des Acetoin-Abbaus (Acetaldehyde, Acetat, Acetyl-CoA, Koenzym A) bzw. des Glucose-Abbaus (Glucose, Pyruvat) auf. Anhand der hier geschilderten Beobachtungen wird deutlich, dass das Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf Acetoin als

Kohlenstoffquelle durch den Citratzyklus und den Glyoxylat-Shunt bestimmt wird, da von diesen Stoffwechselwegen ausgehend alle anabolen Stoffwechselwege bedient werden müssen.

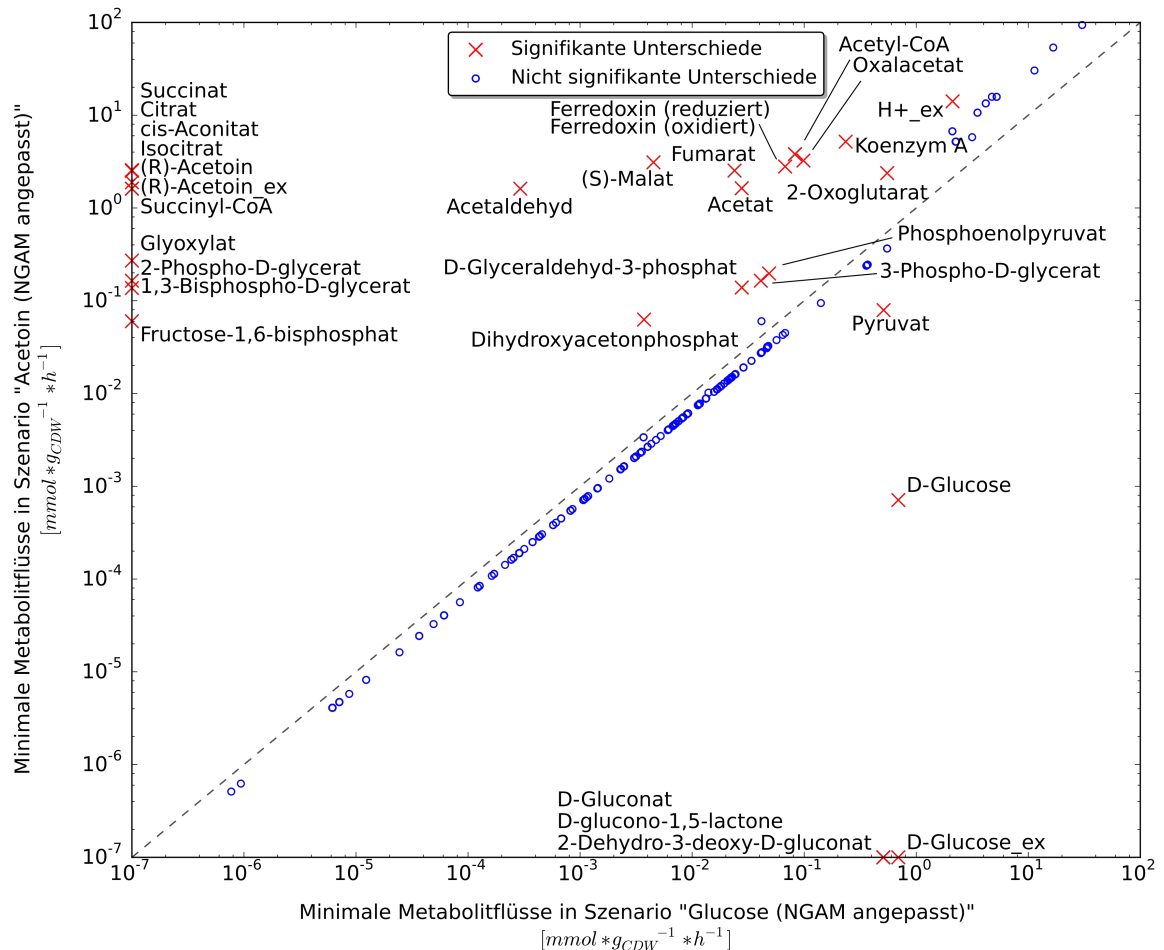


Abbildung 32: Vergleich der mittels suboptimaler MFM ermittelten signifikant veränderten Metabolitflüsse beim modellierten Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf den alleinigen Kohlenstoffquellen Glucose und Acetoin.

Tabelle 20: Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf Acetoin und Phenol als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Die Gesamtflüsse der jeweiligen Metabolite betragen für Acetoin und Phenol 15,7612 / 7,9385 (ATP), 10,9528 / 6,1812 (NADH) und 0,3837 / 0,1932 (NADPH) mmol · g_{BTM}⁻¹ · h⁻¹. Aufgelistet sind die relativen Anteile spezifischer Metabolit produzierender und verbrauchender Reaktionen. Relative Flüsse kleiner als 5 % sind nicht aufgelistet.

Reaktion / Enzym	EC-Nummer	Stoffwechselweg	Anteil in Szenario	
			Acetoin	Phenol
ATP – verbrauchend				
NGAM	-	Energiehaushalt	69,7%	67,9%
Acetat-CoA-Ligase	6.2.1.13	Acetat-Abbau	10,4%	10,2%
ABC-Transporter (Substrat)	-	Transport	10,3%	10,1%
GAM	-	Energiehaushalt	5,0%	5,1%
ATP – produzierend				
ATP-Synthase	3.6.3.14	Atmungskette	85,0%	83,1%
Succinat-CoA-Ligase	6.2.1.5	Citratzyklus	14,9%	16,9%
NADH – verbrauchend				
NADH-Chinon-Dehydrogenase	1.6.5.3	Atmungskette	98,3%	85,3%
Phenol-2-Monooxygenase	1.14.13.7	Phenol-Abbau	0,0%	13,1%
NADH – produzierend				
Malat-Dehydrogenase (NADH)	1.1.1.40	Citratzyklus	25,3%	22,0%
Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.42	Citratzyklus	22,1%	16,8%
Ferredoxin-NADH-Reduktase	1.18.1.3	Redoxreaktionen	21,8%	29,6%
Aldehyd-Dehydrogenase	1.2.1.3	Acetaldehyd-Abbau	15,0%	13,1%
Acetoin-Dehydrogenase	2.3.1.190	Acetoin-Abbau	15,0%	0,0%
Format-Dehydrogenase	1.2.1.2	Format-Abbau	0,0%	13,2%
NADPH – verbrauchend				
Glutamat-Dehydrogenase (NADPH)	1.4.1.3	Aminosäuren	56,8%	53,3%
Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase	1.1.1.34	Isoprenoid-Synthese	10,4%	13,1%
Ketolat-Reduktoisomerase	1.1.1.86	Aminosäuren	7,6%	7,0%
NADPH – produzierend				
Malat-Dehydrogenase (NADPH)	1.1.1.40	Citratzyklus	97,6%	0,0%
Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.42	Citratzyklus	0,0%	97,7%

3.3.2.3 Phenol

Die aromatische Verbindung Phenol wird in der chemischen Industrie besonders zur Herstellung von Bisphenol A benötigt oder entsteht als Intermediat bei der Herstellung von Harzen, Kunstfasern, Lacken und pharmazeutischen Produkten. Aufgrund seiner Schädlichkeit für Mensch und Umwelt sowie seiner Flüchtigkeit und seinem hohen Diffusionsvermögen ist es daher ein weit verbreiteter Schadstoff [225]. Viele Mikroorganismen sind in der Lage auf Phenol als Energie- oder Kohlenstoffquelle zu wachsen und den Schadstoff dadurch abzubauen [226,227]. Auch *S. solfataricus* P2 ist in der Lage, auf Phenol als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen [85] und das Wachstum des Organismus auf diesem Substrat wurde auf Grundlage des Ausgangsmodells erstmals modelliert [92,118]. Der Abbau von Phenol in *S. solfataricus* wurde zudem für den nahe verwandten Stamm 98/2 detailliert untersucht [228–230]. In *S. solfataricus* wird Phenol über eine Phenol-2-Monooxygenase (EC 1.14.13.7) zu Catechol umgewandelt und dieses über vier nachfolgende Reaktionen beginnend mit dem Enzym Catechol-2,3-Dioxygenase (EC 1.13.11.2) zu Format, Acetaldehyde und Pyruvat abgebaut.

Wachstumsrate

Über das Ausgangsmodell von *S. solfataricus* P2 wurde für das Wachstum auf Phenol eine Wachstumsrate von $0,0017 \text{ h}^{-1}$ vorhergesagt. Aussagen bezüglich der Kohlenstoffflüsse wurden im Ausgangsmodell leider nicht getroffen, sodass kein Vergleich stattfinden kann. Die tatsächliche Wachstumsrate auf Phenol beträgt $0,015 \text{ h}^{-1}$ (Tabelle 18) und ist damit deutlich höher als vom Ausgangsmodell vorhergesagt. Dieser Wert sowie die experimentell ermittelte Biomassezusammensetzung und Substrataufnahmerate wurden verwendet, um die NGAM im aktuellen Modell anzupassen. Das Modell ist nun in der Lage, die gemessene Wachstumsrate zu reproduzieren, und sagt für diesen Biomassefluss eine Kohlenstoffbilanz von etwa 14 % vorher. Experimentell wurde für *S. solfataricus* 98/2 gezeigt dass bei Wachstumsraten zwischen $0,011 - 0,024 \text{ h}^{-1}$ die Kohlenstoffbilanz im Bereich von von 27 – 34 % liegt [230]. Diese Kohlenstoffbilanzen sind höher als der vom

aktuellen Modell vorhergesagte Wert von 14 %. Allerdings wurde auch gezeigt, dass bei niedrigen Konzentrationen von gelöstem Sauerstoff bis zu 16 % des Kohlenstoffs in weitere Metabolite fließen, die nicht der Biomasse zugerechnet werden. Zudem liegen noch nicht veröffentlichte Ergebnisse vor, nach denen die Kohlenstoffbilanz für *S. solfataricus* P2 beim Wachstum auf Phenol nur etwa 13,8 % beträgt (Jacqueline Wolf, persönliche Mitteilung, 2017). Da der vorhergesagte Wert mit diesen experimentellen Ergebnissen übereinstimmt, kann das Modell vorerst als validiert gelten. Gleichzeitig werden über das Modell die experimentell ermittelten Rahmendaten (Wachstumsrate, Substrataufnahmerate, Kohlenstoffanteil der Biomasse, Kohlenstoffbilanz) bestätigt, da die über diese Werte festgelegte Verteilung des Kohlenstoffs im Modell ein widerspruchsfreies Gesamtbild ergibt. Bei Festlegung von drei der vier experimentellen Parameter könnte das Modell daher den fehlenden vierten Parameter immer korrekt vorher-sagen.

Zentralstoffwechsel

Durch den Abbau des Phenols werden im metabolischen Modell von *S. solfataricus* P2 wie erwartet 50 % des Kohlenstoffs zu Pyruvat und 33 % zu Acetaldehyd abgebaut (Abbildung 33). Etwa 17 % des Kohlenstoffs werden beim Abbau des Phenols zu Formiat und dieses wiederum über eine Formiat-Dehydrogenase unter Reduktion eines Moleküls NAD^+ zu CO_2 verstoffwechselt (EC 1.2.1.2). Das Acetaldehyd kann wie in Kapitel 3.3.2.2 erwähnt zu Acetyl-CoA umgewandelt werden, wobei ein Molekül NADH produziert und ein Molekül ATP verbraucht wird. Pyruvat wird zu einem Großteil (38 % des Kohlenstoffs) über die Pyruvat-Synthase (EC 1.2.7.1) ebenfalls zu Acetyl-CoA verstoffwechselt. Letztlich werden 50 % des Kohlenstoffs als Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeführt und dort 46 % des Kohlenstoffs zu CO_2 abgebaut. Etwa 9 % des Kohlenstoffs werden in Form von Acetyl-CoA und Pyruvat dazu verwendet über eine Serie von fünf Reaktionen des Isoleucin-Stoffwechsels Propanoyl-CoA zu generieren. Dieses

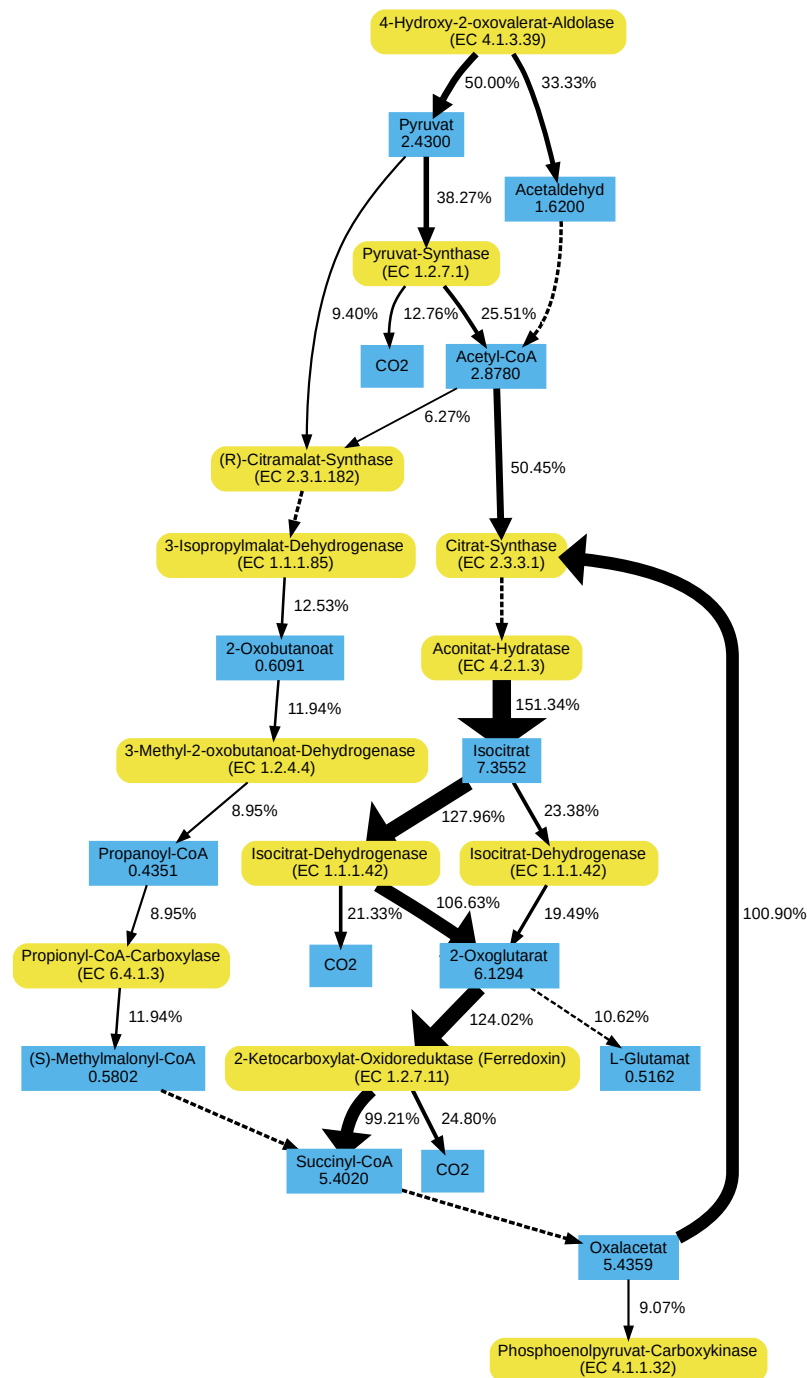
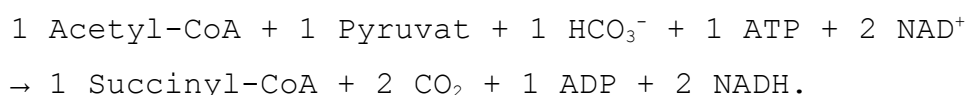


Abbildung 33: Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse in *S. solfataricus* P2 für das Wachstum auf Phenol als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Kohlenstoffflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in $\text{mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Kohlenstoffflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Kohlenstoff, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 5 % werden nicht angezeigt.

wiederum kann über eine Teilreaktion des 3-Hydroxypropionat-/4-Hydroxybutyrat-Zyklus (HP/HB-Zyklus) [88] durch die Propionyl-CoA-Carboxylase (EC 6.4.1.3) zur Fixierung von CO₂ verwendet werden. Dabei wird letztlich Succinyl-CoA generiert, welches vollständig in den Citratzyklus eingebracht wird. Durch die Umgehung der CO₂ produzierenden Reaktionen des Citratzyklus ermöglicht dieser Fluss die Synthese von Biomasse-Vorläufermolekülen, auch wenn netto ein Kohlenstoffatom in Form von CO₂ produziert wird.

Die Netto-Reaktionsgleichung inklusive der drei weiteren Reaktionen des HP/HB-Zyklus lautet:



Das für die Gluconeogenese benötigte Phosphoenolpyruvat (6 % des Kohlenstoffs) wird durch die anaplerotische Reaktion der PEP-Carboxykinase (EC 4.1.1.32) ausgehend von dem Citratzyklus-Intermediat Oxalacetat produziert. Aus den Split-ratio Analysen der Metabolite ATP, NADH und NADPH (Tabelle 20) ist ersichtlich, dass der Citratzyklus für die Synthese des Großteils des benötigten NADH (68 %) und nahezu des sämtlichen NADPH (98 %) verwendet wird. Weitere Anteile an NADH (je 13 %) werden bei der Oxidation von Formiat und Acetaldehyd, welche durch den Abbau des Phenols anfallen, produziert. Der Citratzyklus besitzt demnach beim Wachstum auf Phenol sowohl eine zentrale katabole als auch anabole Funktion.

Essentielle Metabolitflüsse und Variabilität im Modell

Durch das Ausgangsmodell wurde bereits die Hypothese aufgestellt, dass die Reaktionen zur Aufnahme und Verstoffwechselung des Phenols sowie Reaktionen der Gluconeogenese und der PEP-Carboxykinase signifikant erhöht sein müssen. Dies wird durch die Betrachtung der minimalen Metabolitflüsse im aktuellen Modell bestätigt (Abbildung 34), da die minimalen Flüsse der entsprechenden Metabolite stark erhöht sind. Anhand optimaler FVA wurde im aktuellen Modell der

Lösungsraum für das modellierte Wachstum auf Phenol weiter untersucht.

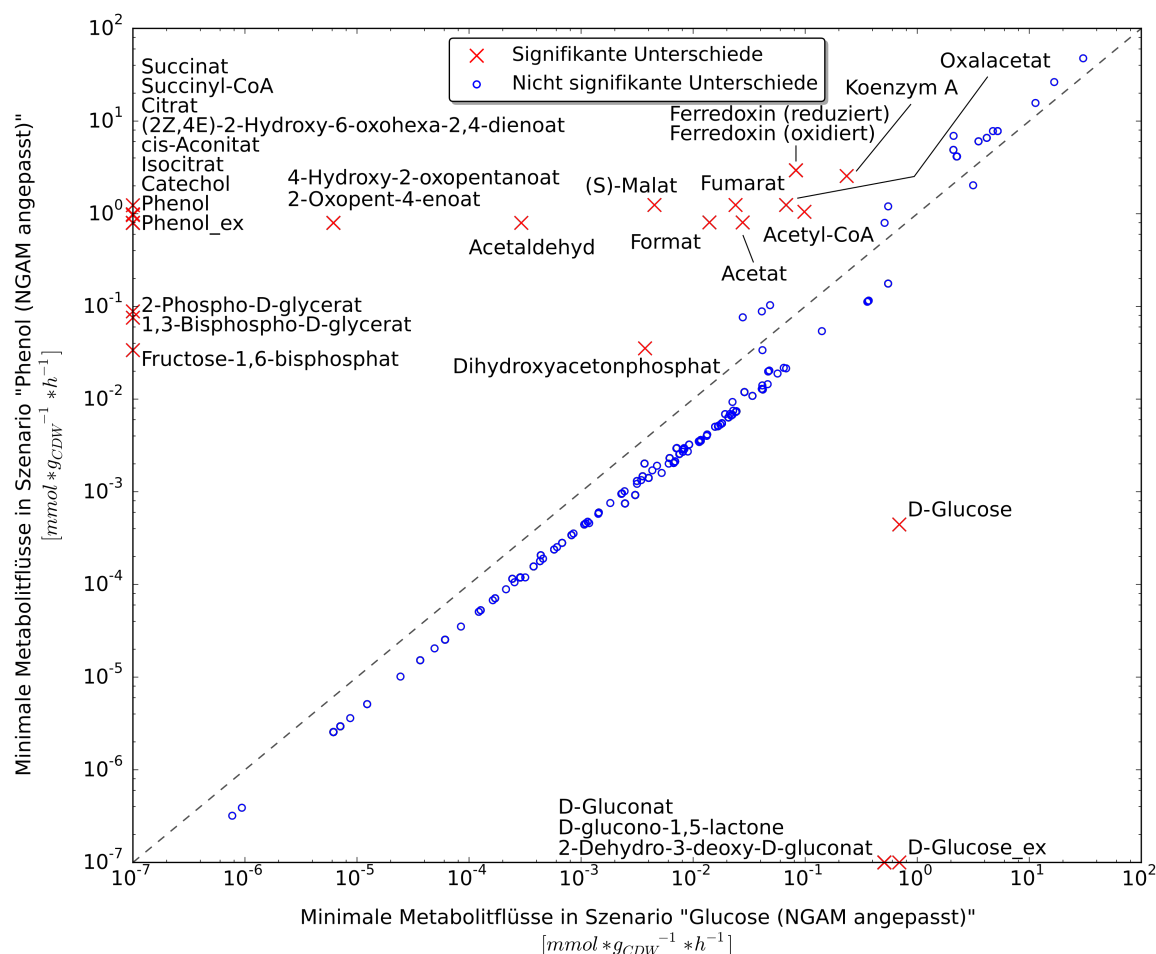


Abbildung 34: Vergleich der mittels suboptimaler MFM ermittelten signifikant veränderten Metabolitflüsse beim modellierten Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf den alleinigen Kohlenstoffquellen Glucose und Phenol.

Interessanterweise stellt die in diesem Szenario im HP/HB-Zyklus beobachtete Synthese von Propanoyl-CoA zu Zwecken der CO₂-Fixierung und der Synthese von Biomasse-Vorläufermolekülen eine Alternative gegenüber dem Glyoxylat-Shunt dar, welcher klassischerweise einen ähnlichen Zweck erfüllt, nämlich die Umgehung CO₂ produzierender Reaktionen des Citratzyklus. Selbst mittels strenger, optimaler FVA sind Flüsse von bis zu 0,14 mmol · g_{BTM}⁻¹ · h⁻¹ durch den Glyoxylat-Shunt möglich. Auch bezüglich anaplerotischer Reaktionen gibt es

Variabilität im aktuellen Modell, da anstelle der PEP-Carboxykinase (EC 4.1.1.32) auch Flüsse von bis zu $0,11 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ durch die Reaktion der Pyruvat-Kinase (EC 2.7.9.2) möglich sind. Der bedeutendste Unterschied zum modellierten Wachstum auf Acetoin ist letztlich jedoch der, dass *S. solfataricus* beim Wachstum auf Phenol wahrscheinlich nicht auf den Glyoxylat-Shunt angewiesen ist. Die aus dem Abbau von Phenol gebildete Menge an Pyruvat ist offenbar ausreichend, um über die Bildung von Propanoyl-CoA und den HP/HB-Zyklus C_4 -Moleküle zu produzieren. Die Synthese von C_4 -Molekülen ausgehend von Phosphoenolpyruvat über die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (EC 4.1.1.31) führt im Modell tatsächlich zu einem niedrigeren Biomassefluss, da dieser Weg energetisch aufwendiger ist.

3.3.2.4 L- und D-Arabinose

L-Arabinose, und in geringeren Anteilen auch D-Arabinose, ist eine in Polysacchariden von Pflanzen sowie in einigen Mikroorganismen natürlich vorkommende Pentose [231,232]. Im Gegensatz zu früheren Berichten ist *S. Solfataricus* P2 in der Lage, nicht nur D-Arabinose [233] sondern auch L-Arabinose abzubauen [210,233]. Beim Wachstum auf D-Arabinose als alleiniger Kohlenstoffquelle erreicht der Organismus sogar höhere Wachstumsraten als beim Wachstum auf Glucose (Tabelle 18). Die Pentose wird in *S. solfataricus* über einen ABC-Transporter mit breiter Substratspezifität aufgenommen, der auch für den Import von Fructose und Xylose verwendet wird [210]. Sowohl D- als auch L-Arabinose können in *S. solfataricus* Aldolase-abhängig über eine Reihe von Reaktionen analog zu denen des nicht-phosphorylierenden Entner-Doudoroff-Wegs zu Glycolaldehyd und Pyruvat gespalten werden. Für D-Arabinose existiert in *S. solfataricus* zudem ein Aldolase-unabhängiger Abbauweg, in welchem das Intermediat 2-Keto-3-deoxy-D-Arabinonat nicht gespalten, sondern über eine 2-Keto-3-deoxy-D-Arabinonat-Dehydratase (EC 4.2.1.141) und eine 2,5-Dioxovalerat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.26) zu 2-Oxoglutarat verstoffwechselt wird [234]. Zwei der Enzyme, die für den Abbau von Arabinose zu Glycolaldehyd und Pyruvat benötigt werden, sind identisch zu denen, die im Entner-Doudoroff-Weg des Organismus verwendet werden. Zum Einen weist eine der beiden Glucose-

Dehydrogenasen in *S. solfataricus*, GDH-1 (EC 1.1.1.359), eine niedrige Substratspezifität auf und ist mit L-Arabinose als Substrat aktiv [204,235]. Zum Anderen wurde gezeigt, dass die für die Spaltung von 2-Keto-3-deoxygluconat verantwortliche Aldolase (EC 4.1.2.55) auch mit 2-Keto-3-deoxy-D/L-Arabinonat aktiv ist und dieses in Glycolaldehyd und Pyruvat spaltet [235]. D-Arabinose wird in *S. solfataricus* im Gegensatz zu L-Arabinose nicht über das Enzym GDH-1 oxidiert, sondern über eine D-Arabinose-Dehydrogenase (vorläufig EC 1.1.1.B35), die auch L-Fucose als Substrat akzeptiert [236].

Wachstumsrate

Die vom Modell vorhergesagte Wachstumsrate auf D-Arabinose liegt sehr an der experimentell beobachteten Wachstumsrate (Tabelle 18). Die Wachstumsrate auf L-Arabinose wird vom Modell jedoch deutlich überschätzt. Wie in Kapitel 3.3.2 angesprochen liegt die Annahme nahe, dass die experimentell ermittelte Substrataufnahmerate oder Kohlenstoffbilanz auf L-Arabinose nicht zu den anderen experimentellen Beobachtungen kompatibel ist. Denn trotz einer höheren Substrataufnahmerate (also einer höheren Kohlenstoffaufnahmerate) und einer höheren Kohlenstoffbilanz (sprich mehr des aufgenommenen Kohlenstoffs wird in die Biotrockenmasse integriert) gegenüber dem Wachstum auf D-Arabinose ist die experimentell beobachtete Wachstumsrate niedriger als beim Wachstum auf D-Arabinose und Glucose. Geht man versuchsweise davon aus, dass nur die experimentelle Substrataufnahmerate und Wachstumsrate für das Wachstum auf L-Arabinose korrekt sind, so wird vom Modell eine Kohlenstoffbilanz von 23 % vorhergesagt, was ein deutlicher Unterschied zu der experimentell ermittelten Kohlenstoffbilanz von 40 % ist. Da nicht geklärt werden kann welche der experimentellen Parameter erneut bestimmt werden sollte und keine alternativen Daten vorliegen, wird in dieser Arbeit mit den gegebenen Parametern weitergearbeitet.

Zentralstoffwechsel

Die Kohlenstoffflüsse durch den Zentralstoffwechsel unterscheiden sich deutlich zwischen dem modellierten Wachstum auf L-Arabinose und D-Arabinose. Während L-Arabinose ausschließlich Aldolase-abhängig gespalten werden kann (Abbildung 35) wird D-Arabinose im Modell ausschließlich Aldolase-unabhängig zu 2-Oxoglutarat verstoffwechselt (Abbildung 36).

Das durch die Spaltung von L-Arabinose produzierte Pyruvat (Abbildung 35) wird zu annähernd gleichen Teilen in die oxidative Decarboxylierung und analog zu dem modellierten Wachstum auf Phenol (Kapitel 3.3.2.3) für die Produktion von Vorstufen der Aminosäure Isoleucin verwendet. Diese Vorstufen können weiter zu Propanoyl-CoA abgebaut werden, welches wiederum über eine Teilreaktion des 3-Hydroxypropionat-/4-Hydroxybutyrat-Zyklus (HP/HB-Zyklus) [88] durch die Propionyl-CoA-Carboxylase (EC 6.4.1.3) zur Fixierung von CO₂ verwendet wird. Dabei wird letztlich Succinyl-CoA generiert, welches in den Glyoxylat-Shunt (31 %) eingebracht wird. Durch die Umgehung beider CO₂ produzierenden Reaktionen des Citratzyklus ermöglicht dieser Fluss die Synthese von C₄-Molekülen. Der Glyoxylat-Shunt wird interessanterweise nicht von Isocitrat aus bedient (EC 4.1.3.1), sondern beide Reaktionen dieses kurzen Stoffwechselweges verbrauchen das aus dem Abbau von L-Arabinose produzierte Glyoxylat (Abbildung 35), um Malat und Isocitrat zu generieren. Damit kann der Glyoxylat-Shunt nicht in der klassischerweise beschriebenen Richtung ablaufen, um die Synthese von C₄-Molekülen zu ermöglichen. Das hierfür benötigte Acetyl-CoA stammt aus der oxidativen Decarboxylierung und das Succinat wird wie eben beschrieben über den Abbau von Isoleucin-Vorstufen produziert. Da alle diese Metabolite in den Citratzyklus münden, sind die Flüsse durch diesen Stoffwechselweg sehr hoch. Kohlenstoff für anabole Stoffwechselwege wird im Citratzyklus an den Verzweigungspunkten 2-Oxoglutarat (33 % des Kohlenstoffs) und Oxaloacetate (25 % des Kohlenstoffs) abgeführt.

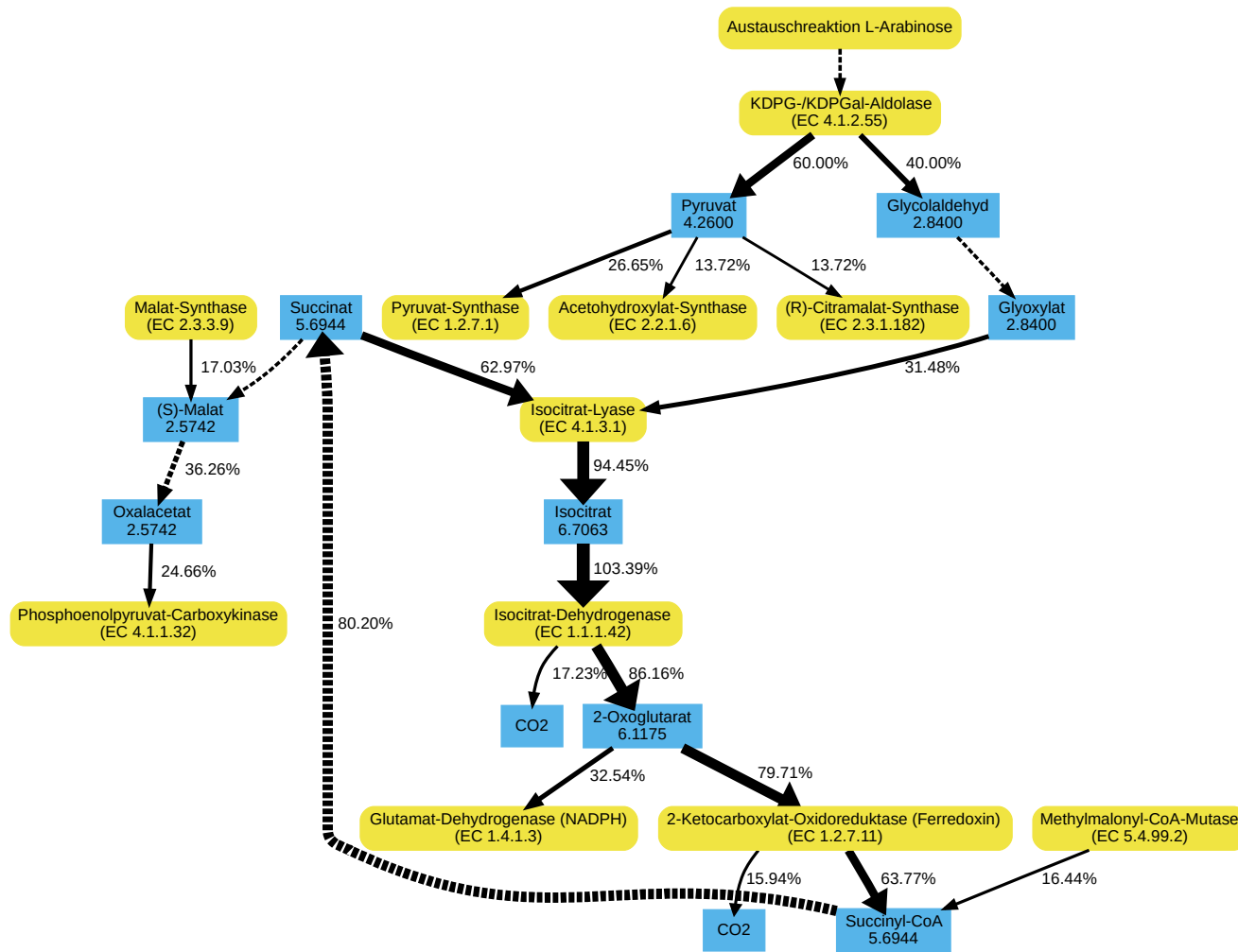


Abbildung 35: Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse in *S. solfataricus* P2 für das Wachstum auf der alleinigen Kohlenstoffquelle L-Arabinose.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Kohlenstoffflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in $\text{mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Kohlenstoffflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Kohlenstoff, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 10 % werden nicht angezeigt.

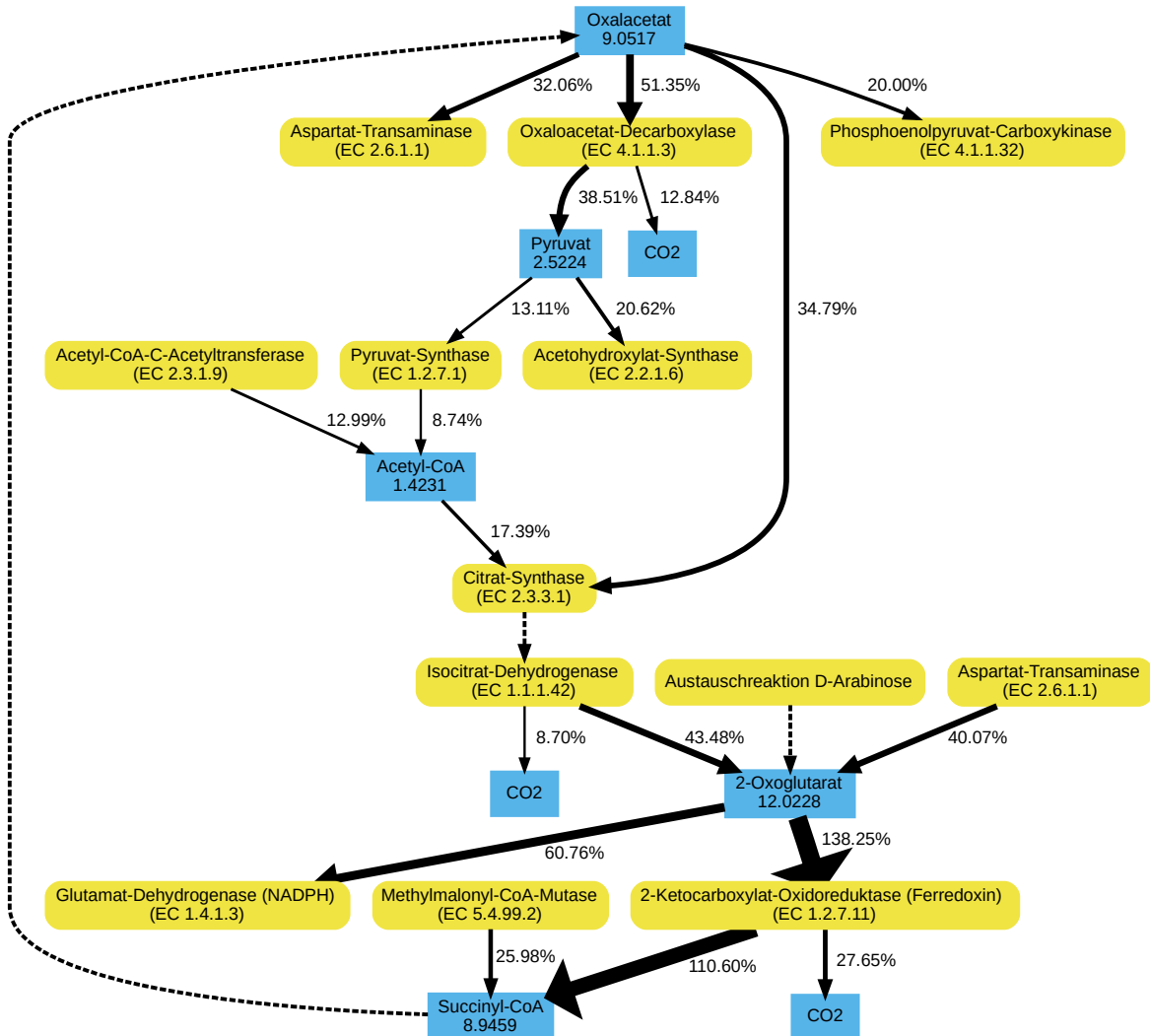


Abbildung 36: Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse in *S. solfataricus* P2 für das Wachstum auf D-Arabinose als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Kohlenstoffflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in $\text{mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Kohlenstoffflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Kohlenstoff, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 5 % werden nicht angezeigt.

D-Arabinose wird im Modell vollständig zu 2-Oxoglutarat umgewandelt und nicht wie L-Arabinose zu Glycolaldehyd und Pyruvat gespalten (Abbildung 36). Das 2-Oxoglutarat wird zum überwiegenden Großteil in den Citratzyklus eingeschleust. Netto werden in Form von Oxalacetat etwa 25 % des Kohlenstoffs für anaplerotische Zwecke (Gluconeogenese, Aminosäurebiosynthese), 25 % für die oxidative Decarboxylierung und 41 % für die Synthese von Succinyl-CoA aus Isoleucin-Vorläufermolekülen (siehe L-Arabinose) verwendet.

Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen beiden Szenarien lassen sich deutlich anhand von Split-ratio Analysen der Reduktionsäquivalente NADH und NADPH erläutern (Tabelle 21). In beiden Szenarien wird nahezu sämtliches NADPH durch die Oxidation der Intermediate des Arabinose-Abbaus generiert. Für L-Arabinose ist dies ausschließlich die mit Glycolaldehyd als Substrat aktive 2,5-Dioxopentanoat-Dehydrogenase und für D-Arabinose zum Einen dasselbe Enzym (mit 2,5-Dioxopentanoat als Substrat) und die D-Arabinose-Dehydrogenase. NADH wird im L-Arabinose Szenario zu 50 % im Citratzyklus, zu 36 % beim Abbau der Arabinose zu Glycolaldehyd und Pyruvat und zu 7 % über den Abbau der Isoleucin-Vorläufermoleküle produziert. Im Gegensatz dazu wird im D-Arabinose Szenario nahezu sämtliches NADH über den Citratzyklus (85 %) und den Abbau der Isoleucin-Vorläufermoleküle (13 %) generiert. Auffällig ist, dass beim modellierten Wachstum auf D-Arabinose mehr NADPH für die Umwandlung der Isoleucin-Vorläufermoleküle zu Succinyl-CoA verbraucht wird, als beim modellierten Wachstum auf L-Arabinose (42 % gegenüber 26 %). Da in diesem Szenario auch ein größerer Anteil an NADH über den Abbau dieser Vorläufermoleküle regeneriert wird, liegt die Vermutung nahe, dass diese Serie von Reaktionen zu einem gewissen Anteil für die Umwandlung von NADPH zu NADH genutzt werden kann. Viel wichtiger ist allerdings, dass diese Reaktionen wie oben beschrieben für die Synthese von C₄-Molekülen verwendet werden. Wie auch beim modellierten Wachstum auf Phenol ist die Verwendung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (EC 4.1.1.31) zur Synthese von C₄-Molekülen energetisch aufwendiger und führt zu einem geringeren Biomassefluss.

Tabelle 21: Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf L- und D-Arabinose als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Die Gesamtflüsse der jeweiligen Metabolite betragen für Acetoin und Phenol 9,5050 / 10,7327 (ATP), 7,8761 / 6,3605 (NADH) und 1,4363 / 2,6297 (NADPH) $\text{mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Aufgelistet sind die relativen Anteile spezifischer Metabolit produzierender und verbrauchender Reaktionen. Relative Flüsse kleiner als 5 % sind nicht aufgelistet.

L-Ara – L-Arabinose; D-Ara – D-Arabinose.

Reaktion / Enzym	EC-Nummer	Stoffwechselweg	Anteil in Szenario	
			L-Ara	D-Ara
ATP – verbrauchend				
NGAM	-	Energiehaushalt	48,2%	53,1%
GAM	-	Energiehaushalt	17,6%	11,6%
ABC-Transporter (Substrat)	-	Transport	14,8%	12,1%
ATP – produzierend				
ATP-Synthase	3.6.3.14	Atmungskette	85,0%	79,2%
Succinat-CoA-Ligase	6.2.1.5	Citratzyklus	14,9%	20,7%
NADH – verbrauchend				
NADH-Chinon-Dehydrogenase	1.6.5.3	Atmungskette	99,3%	99,3%
NADH – produzierend				
Ferredoxin-NADH-Reduktase	1.18.1.3	Redoxreaktionen	26,4%	40,0%
Aldose1-Dehydrogenase	1.1.1.359	L-Arabinose-Abbau	18,0%	0,0%
2,5-Dioxovalerat-Dehydrogenase	1.1.1.26	Arabinose-Abbau	18,0%	0,0%
Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.42	Citratzyklus	15,5%	9,0%
Malat-Dehydrogenase (NADH)	1.1.1.40	Citratzyklus	8,2%	35,6%
3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase	1.1.1.35	Isoleucin-Abbau	3,7%	6,7%
Flavin-Reduktase	1.5.1.36	Redoxreaktionen	3,7%	6,7%
NADPH – verbrauchend				
Glutamat-Dehydrogenase (NADPH)	1.4.1.3	Aminosäuren	32,1%	30,2%
Ketolat-Reduktoisomerase	1.1.1.86	Aminosäuren	22,6%	17,1%
Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (NADPH, phosphorylierend)	1.2.1.13	Gluconeogenese	21,2%	8,7%
Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase	1.1.1.34	Isoprenoid-Synthese	5,9%	2,4%
Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	1.2.1.11	Aminosäuren	1,7%	17,8%
Homoserin-Dehydrogenase	1.1.1.3	Aminosäuren	1,7%	17,8%
NADPH – produzierend				
2,5-Dioxovalerat-Dehydrogenase (Glycolaldehyd)	1.2.1.26	Glycolaldehyd-Abbau	98,6%	0,0%
2,5-Dioxovalerat-Dehydrogenase (2,5-Dioxovalerat)	1.2.1.26	D-Arabinose-Abbau	0,0%	49,7%
D-Arabinose-Dehydrogenase	1.1.1.B35	D-Arabinose-Abbau	0,0%	49,7%

Essentielle Metabolitflüsse und Variabilität im Modell

Ob die vom Modell vorhergesagten Flüsse essentiell, also unabdingbar für einen (sub)optimalen Biomassefluss sind, kann anhand (sub)optimaler MFM und FVA überprüft werden. Anhand der minimalen Metabolitflüsse beim Vergleich des modellierten Wachstums auf D-Arabinose und L-Arabinose (Abbildung 37) ist ersichtlich, dass hohe Flüsse durch den Metaboliten Glyoxylat beim Wachstum auf L-Arabinose nicht vermieden werden können. In diesem Szenario werden 40 % des Kohlenstoffs zu diesem Metabolit umgewandelt und es existiert offenbar keine Alternative zu dem Abbau der L-Arabinose zu Pyruvat und Glycolaldehyd sowie zu der Oxidation von Glycolaldehyd zu Glyoxylat. Auch der Mindestfluss durch den Metaboliten Isocitrat ist in diesem Szenario erhöht. Anhand einer suboptimalen FVA wurde ermittelt, dass die Isocitrat-Lyase (EC 4.1.3.1) essentiell für die Verstoffwechselung des anfallenden Glyoxylat ist und niemals inaktiv werden kann. Über die Malat-Synthase (EC 2.3.3.9) kann stets nur ein gewisser Anteil des Glyoxylat verstoffwechselt werden, jedoch mindestens 21 % des Glyoxylat (optimale FVA). Beim modellierten Wachstum auf D-Arabinose sind die Mindestflüsse für zehn Metabolite, die für den Abbau von Isoleucin-Vorläufermolekülen zu Succinyl-CoA benötigt werden, signifikant erhöht (Oxalacetat, 2-Oxobutanoat, Hydrogencarbonat, Aspartatsemialdehyd, Aspartyl-4-phosphat, Homoserin, Propanoyl-CoA, (R)-Methylmalonyl-CoA, (S)-Methylmalonyl-CoA). Auch anhand suboptimaler FVA wird bestätigt, dass ein Schlüsselenzym für die Serie an Reaktionen, in denen diese Metabolite auftauchen, essentiell ist. Es handelt sich bei diesem Enzym um die Propionyl-CoA-Carboxylase (EC 6.4.1.3). Die oben erwähnte, durch diese Reaktionen ermöglichte Umwandlung Synthese von C₄-Molekülen ist beim modellierten Wachstum auf D-Arabinose daher essentiell für optimale Biomasseflüsse.

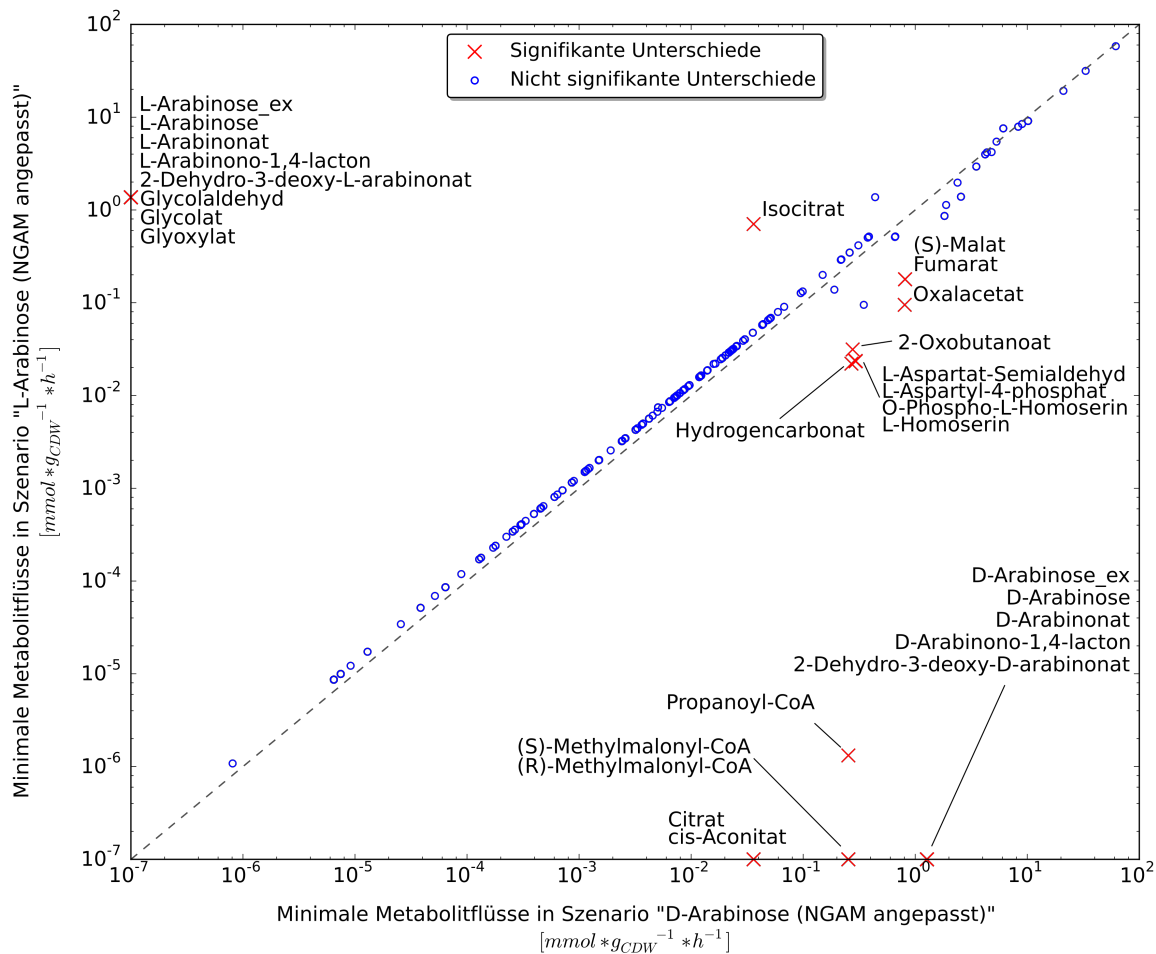


Abbildung 37: Vergleich der mittels suboptimaler MFM ermittelten signifikant veränderten Metabolitflüsse beim modellierten Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf den alleinigen Kohlenstoffquellen D-Arabinose und L-Arabinose.

3.3.2.5 L-Fucose

Die Hexose L-Fucose kommt natürlicherweise in den Zellhüllen und Exopolysacchariden verschiedener Prokaryoten und Eukaryoten vor [237] und ist ein stereochemisches Analog der Pentose D-Arabinose. Der Abbau der Hexose ist in Bakterien gut untersucht worden, allerdings ist über die Verstoffwechselung von L-Fucose in Archaeen nur wenig bekannt. Die einzigen Archaeen, für die Wachstum auf L-Fucose als Kohlenstoffquelle nachgewiesen wurde, sind *S. solfataricus* [181] und *Thermoplasma acidophilum* [238]. In vielen Bakterien weisen die Abbauwege für L-Fucose und D-Arabinose Gemeinsamkeiten auf. So

werden z. B. in *Escherichia coli* K12 für den Abbau von D-Arabinose und L-Fucose (Abbildung 38) dieselben Enzyme verwendet [239]. L-Fucose wird in diesem Organismus über eine Isomerase (EC 5.3.1.25) und Kinase (EC 2.7.1.51) zu Fuculose-1-phosphat umgewandelt und dieses durch eine Aldolase (EC 4.1.2.17) zu Dihydroxyacetonphosphat und Lactaldehyd gespalten. Das Lactaldehyd kann unter aeroben Bedingungen zu Pyruvat oxidiert werden oder es wird unter anaeroben Bedingungen zu 1,2-Propandiol umgewandelt [240], welches wiederum ausgeschleust oder zu Propanol verstoffwechselt wird [241–243]. In *Xanthomonas campestris* erfolgt der Abbau von L-Fucose hingegen Kinase-unabhängig [244] (Abbildung 38). In diesem Organismus wird L-Fucose über eine Dehydrogenase zu L-Fuconolacton und dieses zu L-Fuconat oxidiert. Eine Dehydratase wandelt L-Fuconat zu 2-Keto-3-deoxy-L-Fuconat (KDF) und eine weitere Dehydrogenase diesen Metabolit zu 2,4-Diketo-3-deoxy-L-Fuconat um. Letzteres wird durch eine Hydrolase zu Pyruvat und Lactat gespalten. Bemerkenswerterweise wurde für einige dieser Enzyme bereits eine Aktivität mit den D-Arabinonat und 2-Keto-3-deoxy-D-Arabinonat nachgewiesen [244]. Ein ähnlicher Abbauweg für die Hexose L-Rhamnose konnte in den Organismen *Sphingomonas sp.* und *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* nachgewiesen werden. In diesem Abbauweg wird L-Rhamnose durch analoge Reaktionen ebenfalls zu Pyruvat und Lactat verstoffwechselt [245].

Zu Beginn dieser Arbeit war noch kein Abbauweg für L-Fucose in Archaeen bekannt. Auch im Genom von *S. solfataricus* P2 keine Homologe zu den Enzymen bekannter Abbauwege gefunden werden konnten. Lediglich eine α -L-Fucosidase wurde in *S. solfataricus* bisher identifiziert [246,247]. Im Rahmen des SulfoSYS_{BIOTEC} Projektes²⁰ konnte jedoch aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Modellierungsergebnisse ein Abbauweg für L-Fucose postuliert und anschließend experimentell nachgewiesen werden [181]. Dabei wurde gezeigt, dass *S. solfataricus* einen neuen, gemischten Abbauweg für L-Fucose und D-Arabinose verwendet.

20 SulfoSYS_{BIOTEC}, <http://www.sulfosys.com/>

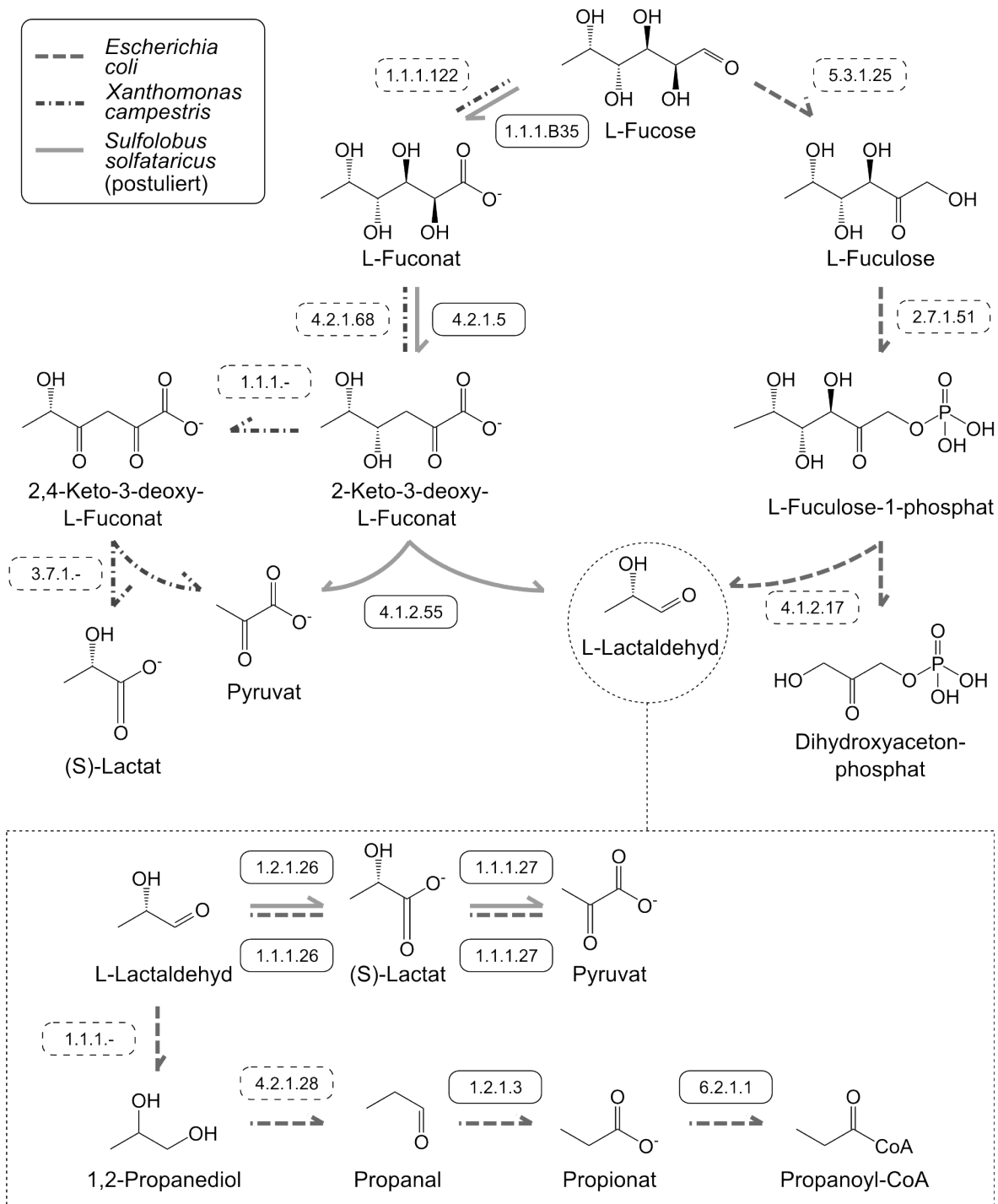


Abbildung 38: Übersicht über die bekannten Abbauwege für L-Fucose in *X. campestris* und *E. coli* sowie über den postulierten Abbauweg für L-Fucose in *S. solfataricus* P2.

Die für die Katalyse von Reaktionen verantwortlichen Enzyme sind durch EC-Nummern angegeben. Für Enzyme mit gestricheltem Rahmen konnten keine Kandidaten / Homologe in *S. solfataricus* identifiziert werden.

Für die Modellierung des Wachstums auf L-Fucose wurden zuerst die experimentell ermittelte Substrataufnahmerate und Biomassezusammensetzung in das Modell integriert (Kapitel 3.3.1). Anschließend wurden drei verschiedene Abbauewege temporär in das Modell eingefügt und das Modell für jedes Szenario durch die Anpassung der NGAM an die experimentelle Kohlenstoffbilanz angeglichen (Tabelle 22). Die folgenden Abbauewege (Abbildung 38) wurden im Modell getestet:

- A) Der aus *E. coli* K12 bekannte Abbau von L-Fucose [239,240] über Fuculose-1-phosphat zu Pyruvat und Dihydroxyacetonphosphat mit anschließender Oxidation von Lactaldehyd zu Pyruvat.
- B) Die aus *X. campestris* bekannte Oxidation von L-Fucose [244] zu 2,4-Keto-3-deoxy-L-Fuconat und dessen Spaltung in Pyruvat und Lactat.
- C) Die Oxidation von L-Fucose zu KDF und dessen Spaltung in Pyruvat und Lactaldehyd analog zum Aldolase-abhängigen Abbau von D-Arabinose in *S. solfataricus* (Kapitel 3.3.2.4) mit anschließender Oxidation von Lactaldehyd zu Pyruvat.

Aus Transkriptom- und Proteomdaten der Projektpartner war ersichtlich, dass die fünf am stärksten heraufregulierten Proteine beim Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf L-Fucose allesamt Teil des Abbauweges von D-Arabinose sind. Bei diesen Enzymen handelt es sich um die D-Arabinonat-Dehydratase (EC 4.2.1.5), die 2,5-Dioxovalerat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.26), die D-Arabinose-1-Dehydrogenase (EC 1.1.1.B35), eine Untereinheit des Arabinose-ABC-Transporters und die 2-Keto-3-deoxy-D-Arabinonat-Dehydratase (EC 4.2.1.141) [181]. Da L-Fucose stereochemisches Analog der Pentose D-Arabinose ist und aus dem Bakterium *E. coli* bereits bekannt war, dass dieses dieselben Enzyme verwendet, um sowohl D-Arabinose als auch L-Fucose zu verstoffwechseln, wurde daher der Abbaueweg C) im Modell getestet. Außerdem konnte die erste Reaktion des Stoffwechselweges C) bereits vorher in das Modell integriert werden, da bereits gezeigt wurde, dass die D-Arabinose-Dehydrogenase aus *S. solfataricus* P2 (EC 1.1.1.B35) L-Fucose als Substrat akzeptiert. Tatsächlich

weist das Enzym mit L-Fucose als Substrat eine duale Kofaktor-Spezifität sowie die höchste Aktivität (k_{cat}) für alle in der Studie untersuchten Substrate auf [236].

Tabelle 22: Für das Modell von *S. solfataricus* P2 eingestellte NGAM-Werte für verschiedene getestete Varianten des Abbaus von L-Fucose.

Die angegebenen Wege beziehen sich auf unterschiedliche Abbauwege für L-Fucose, welche auf Seite 144 folgend näher beschrieben werden.

Weg	Netto-Reaktion	NGAM [mmol · g _{BTM} ⁻¹ · h ⁻¹]
A)	L-Fucose → Fucose-1-phosphat → Pyruvat + DHAP*	4,39
B)	L-Fucose → 2,4-Keto-3-deoxy-L-Fuconat → Pyruvat + Lactat	3,87
C)	L-Fucose → 2-Keto-3-deoxy-L-Fuconat → Pyruvat + Lactat	3,87

* Dihydroxyacetonphosphat

Die angepassten NGAM-Werte (Tabelle 22) sind für alle drei Abbauwege ähnlich hoch, sodass der Energiestoffwechsel sich zwischen diesen Szenarien nicht deutlich unterscheidet. Dies ist nicht zwingend offensichtlich. Es werden zwar in allen drei Stoffwechselwegen pro Molekül L-Fucose drei Moleküle NADH regeneriert, allerdings kann in Stoffwechselweg A) produziertes Dihydroxyacetonphosphat direkt für die Synthese von Phosphoenolpyruvat im Rahmen der Gluconeogenese verwendet werden. In den KDF-abhängigen Szenarien B) und C) muss hingegen für die Synthese von Phosphoenolpyruvat ein Molekül ATP durch die PEP-Synthase (EC 2.7.9.2) zu AMP hydrolysiert werden, wodurch ein weiteres ATP für die Regeneration des AMP zu ADP hydrolysiert werden muss. Dieser Unterschied von netto einem Molekül ATP hat offensichtlich aber keine drastischen Auswirkungen, da wie oben beschrieben die angepassten NGAM-Werte in allen drei Szenarien ähnlich hoch sind.

Durch den Vergleich der Flüsse innerhalb des Modells für alle drei Varianten des L-Fucose-Abbaus mit vergleichenden Transkriptom-, Proteom- und Metabolomdaten [181] für das Wachstum auf Glucose und L-Fucose wurde Stoffwechselweg C) als der wahrscheinlichste Abbauweg für L-Fucose in *S. solfataricus* identifiziert. Basierend auf dieser Entscheidung wurden in folgenden Arbeiten weitere Enzymassays durchgeführt und Knockout-Mutanten erstellt, die letztlich diesen

speziellen Abbauweg in *S. solfataricus* P2 bestätigten [181]. Die Entscheidung für Stoffwechselweg C) fiel aufgrund mehrerer Beobachtungen. Erstens wurde die höchste Übereinstimmung von möglichen aktiven Metaboliten im Modell mit experimentell identifizierten Metaboliten [181] für die KDF-abhängigen Stoffwechselwege B) und C) beobachtet (siehe unten). Zweitens wurden für diese beiden Varianten des L-Fucose-Abbaus maximale Flüsse durch Stoffwechselwege vorhergesagt, die ebenfalls mit experimentell identifizierten Metaboliten übereinstimmen (siehe unten). Drittens können nur für Stoffwechselweg C) Kandidaten für alle benötigten Enzyme vorgeschlagen werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass für diesen Weg davon ausgegangen wird, dass alle Enzyme des bekannten Abbauweges für D-Arabinose auch L-Fucose als Substrat akzeptieren. Für die Stoffwechselwege A) und B) fehlen in *S. solfataricus* je mindestens zwei oder mehr Enzyme, da keine entsprechenden Homologe im Genom des Organismus identifiziert werden konnten. In den Szenarien der Abbauwege B) und C) werden Flüsse durch die meisten Metabolite vorhergesagt, die auch in den Metabolomanalysen detektiert werden konnten (Tabelle 23). Die meisten dieser Metabolite können auch in dem Szenario für Abbauweg A) aktiv werden, nicht jedoch L-Fuconat, welches ausschließlich in Zellen zu detektieren war, die auf L-Fucose wuchsen. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl beim modellierten *in silico* Wachstum als auch beim *in vivo* Wachstum auf L-Fucose Intermediate des Abbaus verzweigtkettiger Aminosäuren (2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA, 2-Methylbutanoyl-CoA) sowie Methylmalonyl-CoA produziert werden können. Letzterer Metabolit ist ein Intermediat des 3-Hydroxypropionat-/4-Hydroxybutyrat-Zyklus (HP/HB-Zyklus) [88]. Wie bereits in den Kapiteln 3.3.2.3 und 3.3.2.4 angesprochen, wird über Reaktionen des Stoffwechsels verzweigtkettiger Aminosäuren Propanoyl-CoA generiert, welches im HP/HB-Zyklus für die CO₂-Fixierung eingesetzt werden kann und die Synthese von Biomasse-Vorläufermolekülen ermöglicht. Aus den maximal möglichen Flüssen durch die Reaktionen des Glyoxylat-Shunts und unterschiedlicher Abschnitte des HP/HB-Zyklus ist erkennbar, dass der Glyoxylat-Shunt alle Abschnitte des HP/HB-

Tabelle 23: Mögliche Aktivitäten von experimentell nachgewiesenen Metaboliten im Modell von *S. solfataricus* beim modellierten Wachstum auf Glucose und L-Fucose.

Aufgelistet sind alle Metabolite, die beim Wachstum auf L-Fucose als alleiniger Kohlenstoffquelle experimentell nachgewiesen wurden [181] und in mindestens einem Szenario aktiv sind. Metabolite, die im Modell ohne Reduktion des Biomasseflusses aktiv werden können sind durch ein „+“ gekennzeichnet, anderenfalls durch ein „-“. Die Abkürzungen A, B, und C beziehen sich auf Abbauewege für L-Fucose, welche auf Seite 144 folgend näher beschrieben werden.

Metabolit	Aktivität möglich in Szenario			
	Glucose	L-Fucose Abbaueweg		
		A)	B)	C)
(S)-3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA	+	+	+	+
(S)-Lactat	-	+	+	+
(S)-Methylmalonyl-CoA	-	+	+	+
2-Aminoadipat	+	+	+	+
2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA	-	+	+	+
2-Methylbutanoyl-CoA	-	+	+	+
Acetoacetyl-CoA	+	+	+	+
Acetyl-CoA	+	+	+	+
Adenosin	+	+	+	+
D-Ribulose-5-phosphat	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
L-Fucose	-	+	+	+
L-Fuconat	-	-	+	+
Glucose-1-phosphat	+	+	+	+
Glycerol-6-phosphat	+	+	+	+
Glycin	+	+	+	+
Koenzym A	+	+	+	+
L-Alanin	+	+	+	+
L-Glutamat	+	+	+	+
L-Isoleucin	+	+	+	+
L-Prolin	+	+	+	+
L-Threonin	+	+	+	+
L-Valin	+	+	+	+
Propan-1,3-diamin	+	+	+	+
Propanoyl-CoA	+	+	+	+
Putrescin	+	+	+	+
Pyruvat	+	+	+	+
S-Methyl-5'-thioadenosin	+	+	+	+
Spermidin	+	+	+	+
Succinat	+	+	+	+
Succinyl-CoA	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+

Zyklus in den KDF produzierenden Szenarien B) und C) die größten Flüsse aufweisen können (Tabelle 24). Der HP/HB-Zyklus lässt sich in drei irreversible Teilabschnitte einteilen. Im ersten wird ausgehend von Acetyl-CoA unter ATP-Verbrauch CO₂ fixiert und somit Malonyl-CoA synthetisiert, welches weiter zu Propanoyl-CoA umgewandelt wird. Dieses wiederum kann im mittleren Abschnitt für die Fixierung eines zweiten Moleküls CO₂ (ebenfalls unter ATP-Verbrauch) zur Synthese von Succinyl-CoA verwendet werden. Im letzten Abschnitt des HP/HB-Zyklus wird Succinyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA umgewandelt und dieses in zwei Moleküle Acetyl-CoA gespalten. Bei vollständiger Aktivität aller Teile des Zyklus wird somit CO₂ fixiert und dabei Acetyl-CoA generiert. Die höheren maximalen Flüsse des ersten und zweiten Abschnitts des HP/HB-Zyklus in den Szenarien B) und C) (Tabelle 24) stimmen mit den Beobachtungen überein, die aus Metabolomdaten gewonnen werden konnten, da Malonyl-CoA nur in Zellen zu detektieren war, die auf L-Fucose wuchsen [181]. In den Metabolomanalysen wurde zudem ein deutlicher Anstieg der intrazellulären Konzentration von Acetoacetyl-CoA festgestellt [181]. Dieser Metabolit kommt im metabolischen Netzwerk von *S. solfataricus* P2 nur in zwei Stoffwechselwegen vor, nämlich im letzten Abschnitt des eben erwähnten HP/HB-Zyklus und als Ausgangs-Molekül der Mevalonat-Biosynthese. Da Isoprenoide sowohl beim Wachstum auf Glucose als auch beim Wachstum auf L-Fucose in vergleichbaren Mengen benötigt werden, liegt der Schluss nahe, dass beim Wachstum auf L-Fucose der letzte Abschnitt des HP/HB-Zyklus aktiv ist. Allerdings sagt das Modell vorher, dass Flüsse durch den ersten (Malonyl-CoA produzierenden) und den letzten (Acetoacetyl-CoA produzierenden) Abschnitt des HP/HB-Zyklus zu niedrigeren Biomasseflüssen führen. Im Vergleich aller drei getesteten Szenarien des L-Fucose-Abbaus sind allerdings für annähernd optimales Wachstum (Biomassefluss von 95 % des Maximums) die maximalen Flüsse durch die entsprechenden Reaktionen in den beiden KDF-abhängigen Szenarien B) und C) am höchsten. Für diese Abbauege reduziert sich der Biomassefluss also in einem geringeren Maße, wenn Malonyl-CoA und Acetoacetyl-CoA im Modell aktiv werden. Auch die höheren maximalen Flüsse durch den Glyoxylat-Shunt stimmen

mit experimentellen Daten überein, denn es wurde durch Transkriptom- und Proteomanalysen gezeigt, dass die Expression der Isocitrat-Lyase des Glyoxylat-Shunts in *S. solfataricus* (Sso1333) beim Wachstum auf L-Fucose signifikant heraufreguliert ist [181]. Das zweite Enzym des Glyoxylat-Shunts, die Malat-Synthase (Sso1334), wird unverändert sowohl auf Glucose als auch L-Fucose exprimiert. Die Induktion der Isocitrat-Lyase wurde interessanterweise ebenfalls beim Wachstum des Organismus auf D-Arabinose festgestellt [234]. Klassischerweise wird der Glyoxylat-Shunt nur verwendet wenn Kohlenstoff ausschließlich in Form von Acetyl-CoA in den Zentralstoffwechsel eingehen kann, allerdings wurde bereits eine hohe Aktivität beider Enzyme des Glyoxylat-Shunts beim Wachstum von *S. acidocaldarius* auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle nachgewiesen [248].

Tabelle 24: Maximal mögliche Flüsse durch ausgewählte Stoffwechselwege beim modellierten Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf L-Fucose.

Die angegebenen Szenarien beziehen sich auf unterschiedliche Abbauwege für L-Fucose, welche auf Seite 144 folgend näher beschrieben werden. Aufgelistet sind die durch suboptimale FVA ermittelten maximalen Flüsse durch anaplerotische und CO₂-fixierende Stoffwechselwege und Reaktionen in den verschiedenen Szenarien.

Tabelle teilweise übernommen aus [181].

Stoffwechselweg	Maximaler Fluss in Szenario [mmol · g _{BTM} ⁻¹ · h ⁻¹]		
	A)	B)	C)
Glyoxylat-Shunt	0,44	0,78	0,78
HP/HB-Zyklus - Teil 1*	0,18	0,19	0,19
HP/HB-Zyklus - Teil 2*	0,47	0,78	0,78
HP/HB-Zyklus - Teil 3*	0,17	0,18	0,18

* Der 3-Hydroxypropionat-/4-Hydroxybutyrat-Zyklus (HP/HB-Zyklus)

lässt sich in drei irreversible Teilabschnitte einteilen:

Teil 1: Reaktionen 1 – 6 (Acetyl-CoA → Propanoyl-CoA),

Teil 2: Reaktionen 7 – 9 (Propanoyl-CoA → Succinyl-CoA),

Teil 3: Reaktionen 10 - 16 (Succinyl-CoA → 2 Acetyl-CoA).

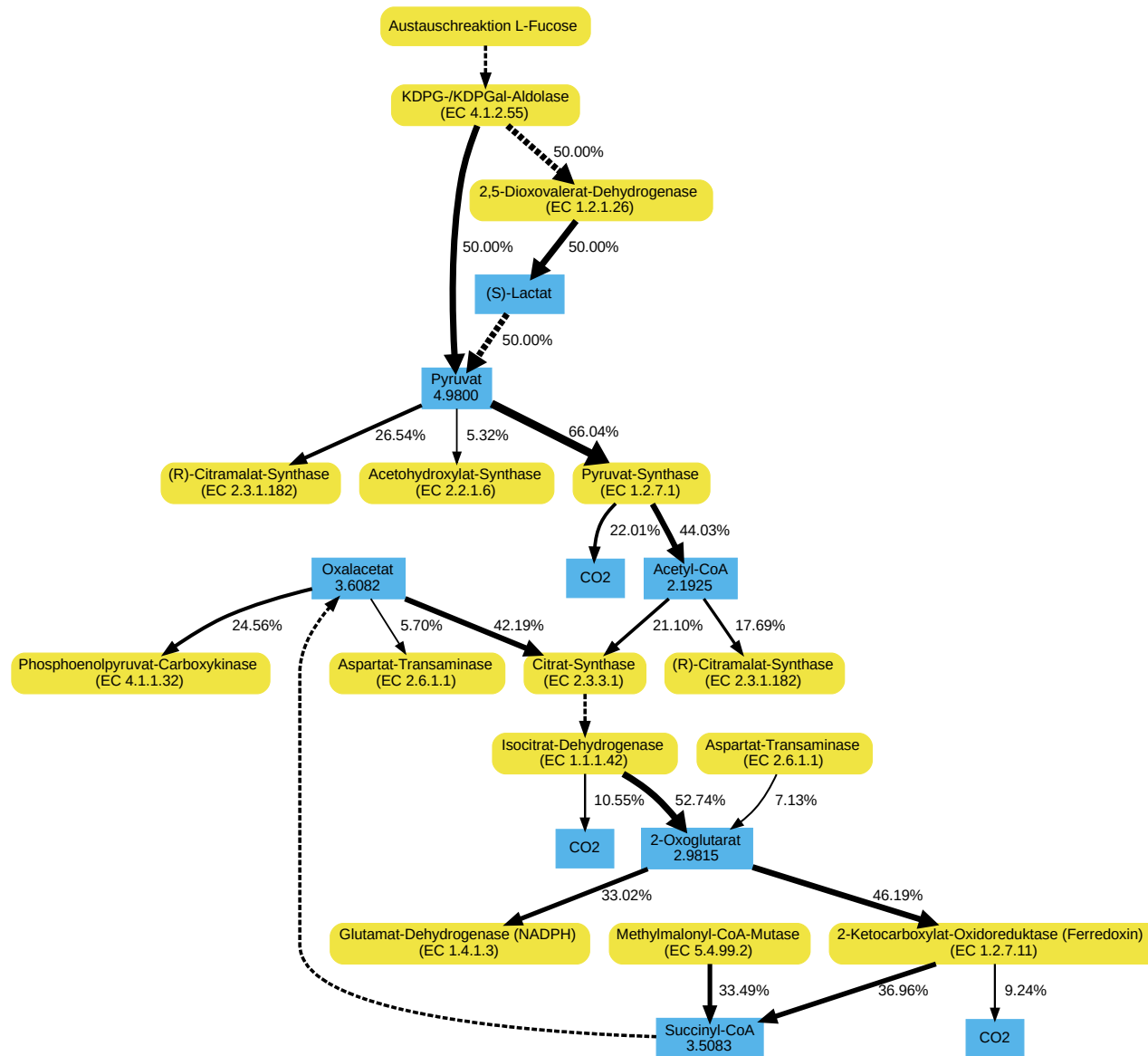


Abbildung 39: Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse in *S. solfataricus* P2 für das Wachstum auf L-Fucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Blau: Metabolite, gelb: Reaktionen. Werte in Metabolitknoten geben die Kohlenstoffflüsse durch den jeweiligen Metaboliten in $\text{mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. Kantenbeschriftungen und -stärke zeigen die relativen Aufspaltungsverhältnisse der Kohlenstoffflüsse, bezogen auf die Gesamtmenge an aufgenommenem Kohlenstoff, durch die benachbarten Reaktionsknoten an. Gestrichelte Kanten bedeuten, dass unverzweigt aufeinanderfolgende Reaktionen ausgelassen wurden. Relative Flüsse kleiner als 5 % werden nicht angezeigt.

Im Folgenden wird das modellierte Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf L-Fucose als alleiniger Kohlenstoffquelle auf Grundlage des mit Hilfe dieser Arbeit postulierten Abbauweges charakterisiert (Abbildung 38). Sämtlicher Kohlenstoff im Modell tritt ausgehend von Pyruvat in den Zentralstoffwechsel ein (Abbildung 39). Der Großteil davon (66 % des Kohlenstoffs) wird über die oxidative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA abgebaut. Ein großer Anteil des Pyruvats (27 % des Kohlenstoffs) sowie des Acetyl-CoA (18 % des Kohlenstoffs) werden im Modell für die Synthese und den folgenden Abbau von Isoleucin-Vorläufermolekülen zu Propanoyl-CoA verwendet, welches im HP/HB-Zyklus zu Succinyl-CoA verstoffwechselt wird (siehe auch Kapitel 3.3.2.3 und 3.3.2.4). Etwa ein Drittel des Succinyl-CoA im Modell wird ausgehend von diesen Reaktionen produziert. Diese Flüsse sind laut optimaler FVA jedoch nicht essentiell, da sie auch null betragen können. Deaktiviert man Schlüsselstellen dieser Reaktionen im mittleren, CO₂-fixierenden Abschnitt des HP/HB-Zyklus, so wird im Modell stattdessen der Glyoxylat-Shunt mit identischen Flüssen aktiv. Laut optimaler FVA beträgt der Maximalfluss durch die eben beschriebenen Reaktionen als auch durch den Glyoxylat-Shunt exakt $0,417 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Offenbar können der mittlere Abschnitt des HP/HB-Zyklus und der Glyoxylat-Shunt also im Modell dieselbe Funktion ausüben. Der mittlere Abschnitt des HP/HB-Zyklus wird dann über den Abbau von Isoleucin-Vorläufermolekülen mit Propanoyl-CoA bedient und erzeugt ausgehend von Acetyl-CoA und Pyruvat Succinyl-CoA, wodurch ebenfalls die CO₂ produzierenden Reaktionen des Citratzyklus umgangen werden. Um das für die Gluconeogenese und andere anabole Stoffwechselwege benötigte Phosphoenolpyruvat (PEP) zu synthetisieren, wird nicht die PEP-Synthase (EC 2.7.9.2) ausgehend von Pyruvat, sondern die PEP-Carboxykinase (EC 4.1.1.32) ausgehend von dem Citratzyklus-Intermediat Oxalacetat aktiv. Auch diese Flussverteilung ist laut optimaler FVA allerdings nicht essentiell, da beide Reaktionen mit einem maximalen Fluss von $0,306 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ aktiv werden können. Split-ratio Analysen der Metabolite ATP, NADH und NADPH (Tabelle 25) zeigen, dass beim modellierten Wachstum auf L-Fucose sämtliches ATP im

Tabelle 25: Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf L-Fucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.

Die Gesamtflüsse der Metabolite betragen 7,3313 (ATP), 5,9128 (NADH) und 0,5740 (NADPH) $\text{mmol} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Aufgelistet sind die relativen Anteile spezifischer Metabolit produzierender und verbrauchender Reaktionen. Relative Flüsse kleiner als 10 % sind nicht aufgelistet.

Reaktion	EC-Nummer	Stoffwechselweg	Relativer Anteil
ATP – verbrauchend			
NGAM	-	Energiehaushalt	52,4%
GAM	-	Energiehaushalt	16,0%
ABC-Transporter (L-Fucose)	-	Transport	11,2%
ATP – produzierend			
ATP-Synthase	3.6.3.14	Atmungskette	88,1%
Succinat-CoA-Ligase	6.2.1.5	Citratzyklus	11,8%
NADH – verbrauchend			
NADH-Chinon-Dehydrogenase	1.6.5.3	Atmungskette	95,4%
NADH – produzierend			
Ferredoxin-NADH-Reduktase	1.18.1.3	Redoxreaktionen	26,6%
Malat-Dehydrogenase (NADH)	1.1.1.40	Citratzyklus	15,2%
Lactat-Dehydrogenase	1.1.1.27	Lactat-Abbau	14,0%
2,5-Dioxovalerat-Dehydrogenase	1.2.1.26	Lactaldehyd-Abbau	14,0%
D-Arabinose-Dehydrogenase	1.1.1.B35	L-Fucose-Abbau	13,4%
NADPH – verbrauchend			
Glutamat-Dehydrogenase (NADPH)	1.4.1.3	Aminosäuren	57,1%
Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase	1.1.1.34	Isoprenoid-Synthese	10,0%
NADPH – produzierend			
Isocitrat-Dehydrogenase	1.1.1.42	Citratzyklus	91,3%

Citratzyklus (12 %) und der oxidativen Phosphorylierung (88 %) generiert wird. Es wird kein also kein ATP im Entner-Doudoroff-Weg produziert, wie es zum Beispiel beim Wachstum auf anderen Hexosen wie Glucose der Fall ist (Kapitel 3.3.2.1). Das generierte ATP wird beim modellierten Wachstum aber ebenfalls zum Großteil (80 %) für den Energiehaushalt (GAM und NGAM) und den Import des Substrats benötigt (Vergleich Glucose: 76 %). Noch deutlicher als die ATP produzierenden Reaktionen unterscheiden sich die NADH produzierenden Reaktionen beim modellierten Wachstum auf L-Fucose und Glucose. Während auf Glucose 79 % des NADH über den Citratzyklus und die oxidative Decarboxylierung sowie weitere

17 % durch den Entner-Doudoroff-Weg generiert werden, sind es im Fucose-Szenario lediglich 42 % des NADH, die über den Citratzyklus und die oxidative Decarboxylierung produziert werden. Weitere 41 % des NADH werden beim modellierten Wachstum auf L-Fucose durch die Oxidation der Fucose und des entstehenden Lactaldehyd zu Pyruvat generiert. Der Citratzyklus besitzt demnach eine deutlich geringere Relevanz für den katabolen Energiestoffwechsel. Gleichzeitig werden über den Citratzyklus beim modellierten Wachstum auf L-Fucose allerdings 91 % des NADPH produziert. Beim Wachstum auf diesem Substrat steigt demnach die Relevanz des Citratzyklus für den anabolen Energiestoffwechsel und es muss für optimales Wachstum entweder der Glyoxylat-Shunt oder der mittlere Abschnitt des HP/HB-Zyklus aktiv werden.

3.3.2.6 Caseinhydrolysat

Der Katabolismus von Aminosäuren ist in *S. solfataricus* bisher nicht gezielt untersucht worden, was vermutlich daran liegt, dass der Organismus nicht in der Lage ist auf einzelnen Aminosäuren (außer Glutamat) als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen [217,233,249]. Hinsichtlich der Biosynthese von Aminosäuren ist *S. solfataricus* P2 prototroph und kann alle seine Aminosäuren selbst produzieren. Dementsprechend konnten Biosynthesewege für alle proteinogenen Aminosäuren auf Grundlage des sequenzierten Genoms annotiert werden [93]. Bezüglich des Abbaus von Aminosäuren wurde beobachtet, dass *S. solfataricus* unterschiedlich auf die Anwesenheit verschiedener Aminosäuren reagiert. So können moderate Konzentrationen von Glutamat und Aspartat das Wachstum von *S. solfataricus* fördern [249], wohingegen hohe Glutamat-Konzentrationen das Wachstum des Organismus hemmen [249,250]. Der hemmende Effekt hoher Glutamat-Konzentrationen ist vermutlich auf die spontane Bildung von Pyroglutamat aus Glutamat bei niedrigen pH-Werten und Temperaturen $> 78\text{ }^{\circ}\text{C}$ zurückzuführen [250,251], da vermutet wird, dass Pyroglutamat als Protonophor agiert und damit die Atmung und pH-Homöostase stört [252,253]. Der Abbau von Glutamat und Aspartat erfolgt in *S. solfataricus* P2 wahrscheinlich durch die Enzyme Glutamat-Dehydrogenase [254,255] und Aspartat-Transaminase [256]. Für den Abbau anderer Aminosäuren durch

S. solfataricus existiert keine weitere Literatur. In einigen anaeroben Archaeen (obligat aerobe Archaeen wie *S. solfataricus* sind vergleichsweise selten [257]) erfolgt der Abbau einzelner Aminosäuren durch oxidative Stickland-Reaktionen mit organischen Säuren als Endprodukten (Abbildung 40) [258]. Solche Stickland-Reaktionen sind klassischerweise aus anaeroben Bakterien bekannt. In diesen

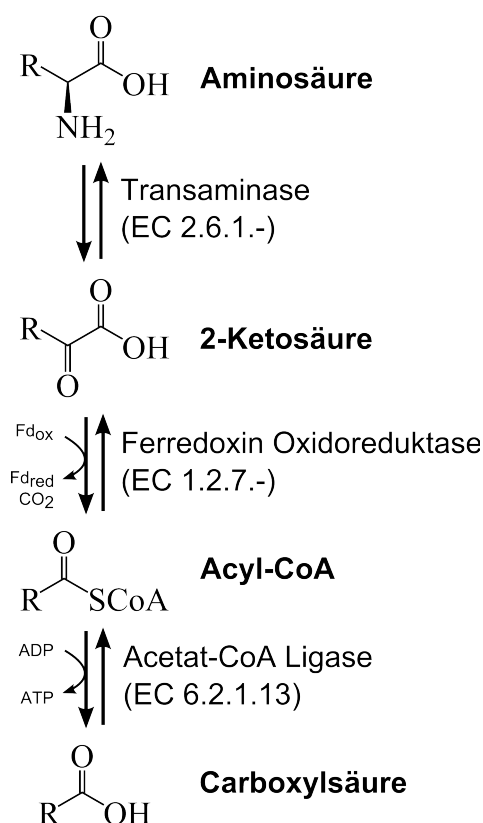


Abbildung 40: Schema des Abbaus von Aminosäuren über oxidative Stickland-Reaktionen in Archaeen.

Abbildung nach [267].

Organismen überträgt ein reduzierender Zweig der Stickland-Reaktionen Elektronen aus der Oxidation von Aminosäuren auf andere Akzeptor-Aminosäuren im oxidativen Zweig [259–261]. Wie oben bereits erwähnt wurde in Archaeen allerdings nur der oxidative Zweig beobachtet. In diesem Zweig der Stickland-Reaktionen werden drei aufeinanderfolgende Enzyme für den oxidativen Abbau von Aminosäuren benötigt. Dies sind erstens eine Transaminasen (EC 2.6.1.-),

zweitens eine 2-Ketosäure-Ferredoxin Oxidoreduktase (EC 1.2.7.-) und drittens eine Acetat-CoA-Ligase (EC 6.2.1.13). Die in Archaeen für die Umwandlung der 2-Ketosäuren zu entsprechenden Acyl-CoA-Derivaten verantwortlichen Ferredoxin-abhängigen Oxidoreduktasen werden je nach ihrer Substratspezifität in verschiedene Klassen unterteilt. Als Substrate dieser Enzyme sind bisher Pyruvat (EC 1.2.7.1) [262], 2-Oxoglutarat (EC 1.2.7.11) [263], verzweigtkettige Aminosäuren (EC 1.2.7.7) [264] und aromatische Aminosäuren (EC 1.2.7.8) [265] bekannt. Relevant für den Katabolismus von Aminosäuren sind lediglich die letzten drei EC-Klassen. In Archaeen konnten bisher entsprechende Enzyme charakterisiert werden, die *in vitro* 2-Ketosäuren ausgehend von den Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin und Glutamat produzieren [264,266]. Zudem wurde gezeigt, dass *Thermococcus kodakarensis* 2-Ketosäuren exportiert, wenn der Organismus extrazellulären Aminosäuren ausgesetzt wird [258].

Um den Katabolismus von Aminosäuren in *S. solfataricus* zu studieren, wurde in dieser Arbeit das Wachstum des Organismus auf Caseinhydrolysat als alleiniger Kohlenstoffquelle simuliert. Die absoluten Bestandteile dieses Mediums sind bekannt [267]. In der Arbeitsgruppe wurden zudem die Biomassezusammensetzung des Organismus (Tabelle 17) und Aminosäureaufnahme-raten (Tabelle 26) ermittelt [182]. Diese Daten konnten anschließend erfolgreich in das metabolische Modell integriert werden (Kapitel 3.3.1). Die NGAM im Modell wurde an die experimentell beobachtete Wachstumsrate (Tabelle 18) angepasst. Da in anderen Archaeen bereits die Oxidation von Aminosäuren zu organischen Säuren durch Stickland-Reaktionen beobachtet wurde und in *S. solfataricus* die entsprechenden Enzyme ebenfalls annotiert werden können, wurde im Modell die Oxidation aller verzweigtkettigen Aminosäuren (Abbildung 41) sowie von Phenylalanin und Tyrosin (Abbildung 42) zu bereits bekannten Produkten oxidativer Stickland-Reaktionen ermöglicht (Isovalerat, 2-Methylbutanoat, Isobutanoat, Phenylacetat, 2-Hydroxyphenylacetat, 4-Hydroxyphenylacetat). Da außerdem in Metabolomanalysen von Zellen, die auf L-Fucose als alleiniger

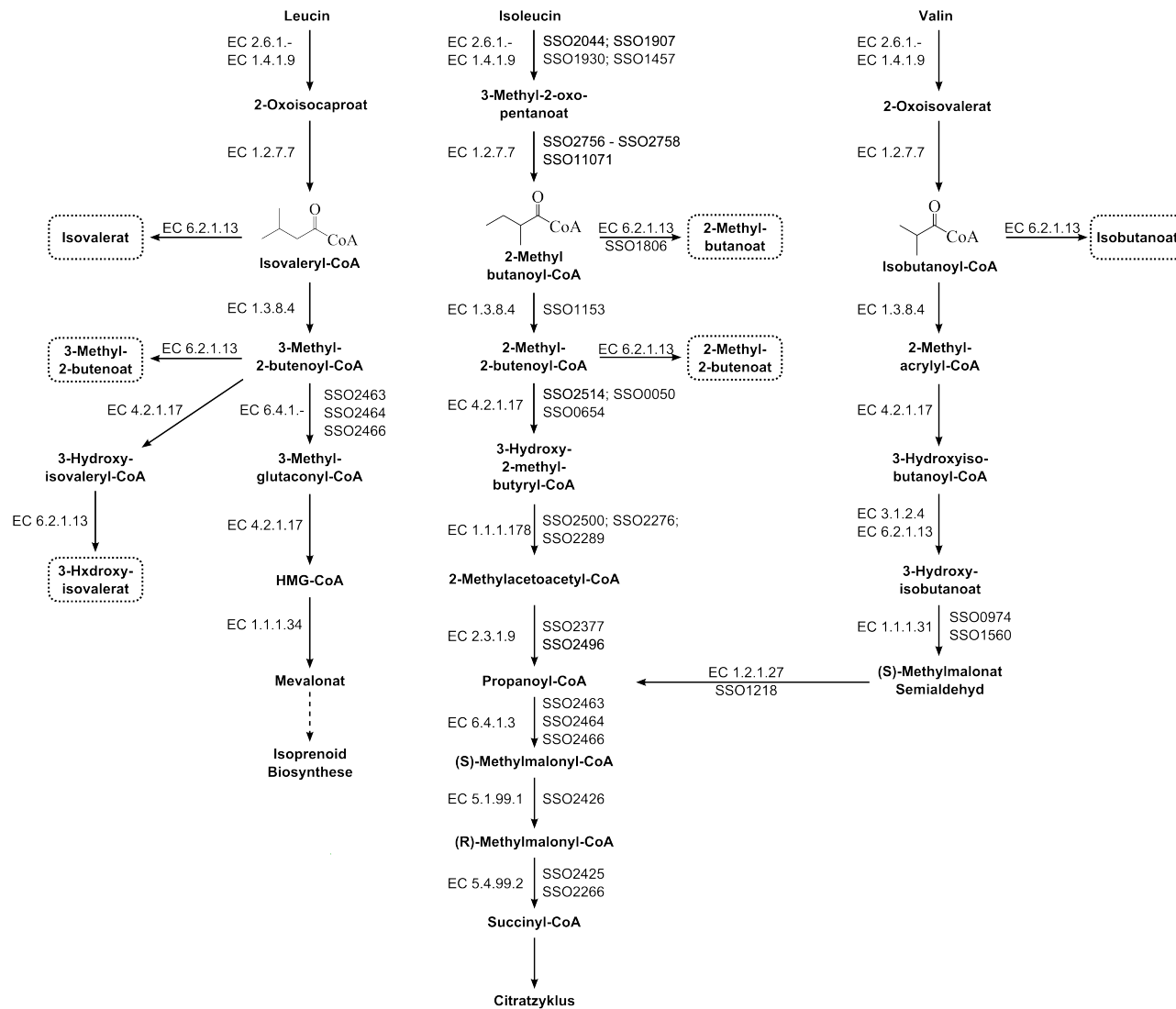


Abbildung 41: Katabolismus der verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin im metabolischen Modell von *S. solfataricus* P2.

Die angegebene Genloci sind im metabolischen Modell hinterlegt. Reaktionen mit derselben EC-Nummer werden im Modell durch dasselbe Enzym katalysiert, sodass die dazugehörigen Genloci nur einmal aufgelistet sind. Eingekreiste Metabolite können im metabolischen Modell nicht weiter verstoffwechselt werden und müssen exportiert werden.

HMG-CoA: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA.

Abbildung nach [182].

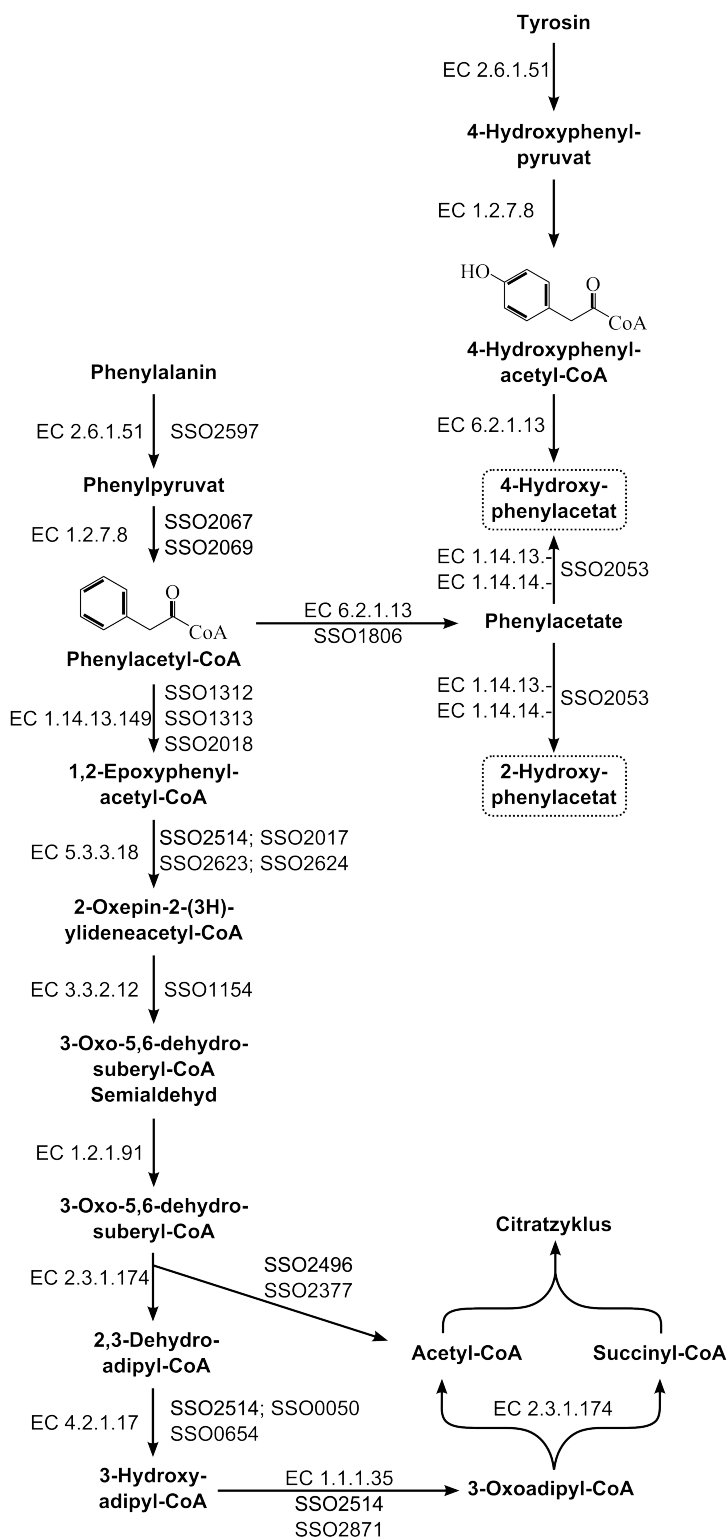


Abbildung 42: Katabolismus der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin im metabolischen Modell von *S. solfataricus* P2.

Die angegebene Genloci sind im metabolischen Modell hinterlegt. Reaktionen mit derselben EC-Nummer werden im Modell durch dasselbe Enzym katalysiert, sodass die dazugehörigen Genloci nur einmal aufgelistet sind. Eingekreiste Metabolite können im metabolischen Modell nicht weiter verstoffwechselt werden und müssen exportiert werden.

Abbildung nach [182].

Kohlenstoffquelle wuchsen, die Metabolite 3-Methyl-2-butenolat und 2-Methyl-2-butenolat identifiziert werden konnten [182], wurden ebenfalls Reaktionen in das Modell integriert, die ausgehend von den bereits im Modell vorhandenen CoA-Verbindungen dieser Metabolite die entsprechenden organischen Säuren produzieren. Hierfür mussten lediglich weitere Reaktionen der Acetat-CoA-Ligase (EC 6.2.1.13) in das Modell eingefügt werden (Abbildung 41). Analog wurde auch für den experimentell identifizierten Metaboliten 3-Hydroxyisovalerat [182] verfahren, außer dass für die Produktion dieses Metaboliten im Modell zusätzlich eine weitere Reaktion der Enoyl-CoA-Hydratase (EC 4.2.1.7) postuliert werden musste. Letztlich konnten die Modellierungsergebnisse dieser Arbeit im Rahmen des SulfoSYS_{BIOTEC} Projektes²¹ verwendet werden, um ein übersichtliches Bild des Aminosäure-Katabolismus in *S. solfataricus* zu gewinnen [182].

Für die Analyse der Modellflüsse beim modellierten Wachstum auf Caseinhydrolysat wurden zwei verschiedene Szenarien erstellt. Im ersten Szenario wurden keine zusätzlichen Einschränkungen für den Aminosäure-Abbau eingestellt, sodass die Verteilung der Flüsse durch die FBA frei optimiert werden kann (Szenario „frei“). Dieses Szenario wurde auch für die Anpassung der NGAM an die experimentell beobachtete Wachstumsrate verwendet. Im zweiten Szenario wurden im Modell zwei aus Bakterien bekannte und in *S. solfataricus* vorhandene Abbaupfade für die Aminosäuren Isoleucin und Phenylalanin deaktiviert, um so für diese Aminosäuren den Abbau über oxidative Stickland-Reaktionen zu 2-Ketosäuren zu erzwingen (Szenario „Stkl.“). Der bakterielle Abbaupfad für Phenylalanin wurde 2010 von Teufel *et al.* postuliert [171] und konnte im Rahmen des SulfoSYS_{BIOTEC} Projektes ebenfalls für *S. solfataricus* und damit für Archaeen bestätigt werden [182]. In beiden Simulationen werden alle 10 Aminosäuren, für die experimentell die Aufnahme durch *S. solfataricus* P2 bewiesen wurde, ebenfalls mit dem maximal möglichen Fluss aufgenommen. Aus den Aufnahmeraten der einzelnen Aminosäuren (Tabelle 26) ist ersichtlich, dass der Großteil des Kohlenstoffs im Modell durch die Aufnahme von Glutamat (46 %) und

21 SulfoSYS_{BIOTEC}, <http://www.sulfosys.com/>

Tabelle 26: Aufnahmeraten und vorhergesagte Abbauwege für Aminosäuren im metabolischen Modell von *S. solfataricus* P2.

Die Aminosäureaufnahmeraten wurden in der Arbeitsgruppe experimentell ermittelt und in das metabolische Modell von *S. solfataricus* P2 integriert. Relative Flüsse kleiner als 5 % sind nicht aufgelistet. Die Tabelle wurde zum Großteil übernommen aus [182].

¹ Fehlende Anteile werden in der Biomassereaktion verbraucht. Wenn mehrere Stoffwechselwege in einer Zeile genannt werden, wurden die Anteile aller dieser Stoffwechselwege aufsummiert.

² Szenario ohne Einschränkungen bezüglich der Abbauwege für Aminosäuren.

³ Szenario in dem bakterielle Abbauwege für Aminosäuren deaktiviert wurden, sodass im Modell Flüsse durch alle vorhandenen oxidativen Stickland-Reaktionen (Stkl.) erzwungen werden.

⁴ Biomassekomponenten wie Aminosäuren und Nukleotide sind nicht aufgeführt.

Aminosäure	Aufnahmerate [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{CDW}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] (Kohlenstoffanteil)		Abbau durch Stoffwechselweg	Anteil ¹ in Szenario [%]		Produkt(e) ⁴
				frei ²	Stkl. ³	
Alanin	42,1	(4,8%)	Transaminierung mit 2-Oxoglutarat	75,8	78,7	Pyruvat
Aspartat	44,7	(6,8%)	Transaminierung mit 2-Oxoglutarat	22,2	31,4	Oxalacetat
			Asparagin-Biosynthese	20,0	17,6	
			Arginin-Biosynthese	19,9	17,5	
			Nukleotid-Biosynthese	18,7	16,5	
Glutamat	241,8	(45,8%)	Deaminierung durch Glutamat-Dehydrogenase	62,7	68,0	2-Oxoglutarat
			Transaminierung für Biosynthese von Arginin, Glutamin, Valin, Serin, Glycin, Cystein und Lysin	34,2	29,4	2-Oxoglutarat
Glycin	6,7	(0,5%)	Nukleotid-Biosynthese	21,2	21,2	
Isoleucin	28,1	(6,4%)	Bakterieller, aerober Abbauweg	38,7	-	Succinyl-CoA
			Oxidative Stickland-Reaktionen	-	46,0	2-Methylbutanoat
Leucin	76,1	(17,3%)	Oxidative Stickland-Reaktionen	49,0	55,0	3-Methyl-2-butenat
			Umwandlung in Mevalonat für Isoprenoid-Biosynthese	26,4	23,3	

Aminosäure	Aufnahmerate [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{CDW}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] (Kohlenstoffanteil)		Abbau durch Stoffwechselweg	Anteil ¹ in Szenario [%]		Produkt(e) ⁴
				frei ²	Stkl. ³	
Methionin	21,6	(4,1%)	Abbau über Cystathionin und 2-Oxobutanoat	72,5	75,7	Propanoyl-CoA
			Biosynthese von Cobalamin, Sulfoloboschinon und Polyaminen über S-Adenosyl-L-Methionin	9,7	8,6	
Phenylalanin	21,9	(7,5%)	Bakterieller, aerober Abbauweg [171]	63,6	-	2x Acetyl-CoA 1x Succinyl-CoA
			Oxidative Stickland-Reaktionen	-	67,9	2-Hydroxyphenylacetat
Threonin	19,7	(3,0%)	Abbau über 2-Oxobutanoat	56,2	61,4	Propanoyl-CoA
			Cobalamin-Biosynthese	1,0	0,9	
Tyrosin	11,4	(3,9%)	Oxidative Stickland-Reaktionen	20,8	30,2	4-Hydroxyphenylacetat

Leucin (17 %) erfolgt. Im frei optimierten Szenario werden etwa 42 % des aufgenommenen Kohlenstoffs aus Glutamat im Modell durch De- und Transaminierungsreaktionen zu 2-Oxoglutarat umgewandelt, welches nahezu vollständig in den Citratzyklus eingebracht wird (37 % des Kohlenstoffs). In beiden Szenarien werden die Aminosäuren Leucin und Tyrosin bereits durch oxidative Stickland-Reaktionen zu entsprechenden 2-Ketosäuren (3-Methyl-2-butenolat bzw. 4-Hydroxyphenylacetat) abgebaut. Interessanterweise wird im Modell Leucin im Rahmen der oxidativen Stickland-Reaktionen nicht zu Isovalerat, sondern nur zu 3-Methyl-2-butenolat abgebaut, da durch den zusätzlichen Oxidationsschritt unter Bildung des Intermediats 3-Methyl-2-butenoyl-CoA ein zusätzliches Reduktionsäquivalent regeneriert werden kann. Leucin wird im frei optimierten Szenario zu einem gewissen Anteil auch im Rahmen der Isoprenoid-Biosynthese zu Mevalonat verstoffwechselt (26 %). Die über oxidative Stickland-Reaktionen produzierten organischen Säuren werden im Modell exportiert und können nicht

weiter verstoffwechselt werden. Im erzwungenen Stickland-Szenario werden zusätzlich zu Leucin und Tyrosin auch noch die Aminosäuren Isoleucin und Phenylalanin zu organischen Säuren abgebaut (Tabelle 26). Für Isoleucin und Phenylalanin existieren im metabolischen Netzwerk von *S. solfataricus* P2 aus Bakterien bekannte alternative Abbauwege über welche diese Aminosäuren zu Succinyl-CoA und Acetyl-CoA abgebaut werden können. Diese Metabolite wiederum können in den Citratzyklus eingebracht und die Aminosäuren damit vollständig zu CO₂ abgebaut oder für die Biosynthese von Biomasse-Komponenten verwendet werden. Letzteres ist durch die Verwendung der oxidativen Stickland-Reaktionen nicht möglich. Im Gegenteil, der Export der über diese Reaktionen gebildeten organischen Säuren entspricht einem Verlust an Kohlenstoff. Daher werden Isoleucin und Phenylalanin im frei optimierten Szenario nicht über oxidative Stickland-Reaktionen, sondern über die bakteriellen Stoffwechselwege abgebaut. Im erzwungenen Stickland-Szenario werden etwa 15,9 % des Kohlenstoffs in Form von 2-Ketosäuren aus dem Modell exportiert, verglichen zu 7,7 % im frei optimierten Szenario. Im erzwungenen Stickland-Szenario sinkt der vorhergesagte Biomassefluss um etwa 13 % von 0,030 h⁻¹ auf 0,026 h⁻¹. Die Ursache hierfür liegt in dem eben erwähnten, höheren Kohlenstoffverlust im erzwungenen Stickland-Szenario, da die Zielfunktion für die Optimierung des metabolischen Modells optimale Biomasseproduktion ist. Das Modell ist daher auf eine optimale Verwendung von Kohlenstoff angewiesen. Dies muss *in vivo* jedoch nicht zwingend zutreffen, da gezeigt wurde, dass das Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf Caseinhydrolysat nicht kohlenstofflimitiert ist [182]. In beiden Szenarien des modellierten Wachstums auf Caseinhydrolysat wird der Großteil des ATP durch die oxidative Phosphorylierung und den Citratzyklus produziert (Tabelle 27). Allerdings werden auch geringe Mengen, etwa 3 % des ATP und damit etwa ein Fünftel des ATP, welches im Modell aus dem Abbau von Aminosäuren gewonnen werden kann, durch oxidative Stickland-Reaktionen produziert. Der Unterschied zwischen dem frei optimierten und dem erzwungenen Stickland-Szenario ist dabei sehr gering.

Im metabolischen Netzwerk von *S. solfataricus* stellen die oxidativen Stickland-Reaktionen die einzige Möglichkeit des Abbaus der Aminosäuren Leucin und Tyrosin dar. Für die Aminosäuren Isoleucin, Valin und Phenylalanin existieren hingegen andere Abbauwege, über welche diese Metabolite effizienter verstoffwechselt werden können.

Tabelle 27: Anteile ATP produzierender Stoffwechselwege beim modellierten Wachstum von *S. solfataricus* P2 auf Caseinhydrolysat als alleiniger Kohlenstoffquelle.

In den aufgelisteten Werten wurde die Produktion von reduzierten Reduktionsäquivalenten mit einberechnet, da diese in der oxidativen Phosphorylierung für die ATP-Synthese verwendet werden können. Die Tabelle wurde übernommen aus [182].

¹ Szenario ohne Einschränkungen bezüglich der Abbauwege für Aminosäuren.

² Szenario in dem bakterielle Abbauwege für Aminosäuren deaktiviert wurden, sodass im Modell Flüsse durch alle vorhandenen oxidativen Stickland-Reaktionen (Stkl.) erzwungen werden.

Stoffwechselweg	ATP-Produktion in Szenario [%]	
	frei ¹	Stkl. ²
Citratzyklus	72,0	68,9
Aminosäure-Abbau (exklusive oxidativer Stickland-Reaktionen)	15,2	17,1
Oxidative Decarboxylierung von Pyruvat	6,6	7,1
Aminosäure-Abbau (oxidative Stickland-Reaktionen)	2,8	3,2

werden können. Allerdings wurde durch Metabolomanalysen gezeigt, dass die drei Aminosäuren in *S. solfataricus* P2 dennoch auch unvollständig über oxidative Stickland-Reaktionen verstoffwechselt werden [182]. Der unvollständige Abbau von Aminosäuren über diese Reaktionen trägt zur ATP-Produktion im metabolischen Netzwerk des Organismus bei (Tabelle 27). Darüber hinaus erklärt der Abbau von Aminosäuren über oxidative Stickland-Reaktionen, warum *S. solfataricus* nicht in der Lage ist auf diesen Aminosäuren als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Bemerkenswerterweise ist *S. solfataricus* damit der erste obligat aerobe Organismus, für den oxidative Stickland-Reaktionen beschrieben werden. Um die Verteilung der für diese Reaktionen notwendigen Enzyme in Archaeen weiter nachvollziehen zu können, wurden BLAST-Suchen mit den Proteinsequenzen der Ferredoxin-abhängigen Oxidoreduktasen (EC 1.2.7.7, EC 1.2.7.8) und der Acetat-CoA-Ligase (EC 6.2.1.13) aus dem Crenarchaeon

S. solfataricus sowie dem Euryarchaeon *Pyrococcus furiosus* gegen alle verfügbaren Sequenzen von Archaeen durchgeführt. Dabei wurden Homologe in 179 Organismen aus beiden Phyla gefunden (Anhang 7), die damit vermutlich ebenfalls zu oxidative Stickland-Reaktionen befähigt sind. Von diesen 179 Organismen sind nur fünf obligate Aerobier beschrieben wurden, die allesamt zu den Sulfolobaceae und damit den Crenarchaeen zugeordnet werden, nämlich *Metallosphaera cuprina*, *Metallosphaera sedula*, *Sulfolobus islandicus*, *Sulfolobus solfataricus* und *Sulfolobus tokodaii*. Die Fähigkeit zu oxidativen Stickland-Reaktionen unter obligat aeroben Bedingungen ist daher vermutlich nicht nur auf *S. solfataricus*, jedoch konkret auf die Familie der Sulfolobaceae beschränkt.

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird eine datenbankbasierte Modellierungsplattform für die Rekonstruktion und Analyse metabolischer Modelle vorgestellt, welche erstmalig die Durchführung großangelegter Batch-Simulationen sowie die Visualisierung von *in silico* Kohlenstoffflüssen ermöglicht. Die Planung und Ausführung von Batch-Simulationen erfolgt teilautomatisiert und wird durch die standardisierte Speicherung von Modellvariablen, wie z. B. Substrataufnahmeraten und Energieparametern, unterstützt.

Die Interpretation von Modellflüssen wird durch neue graphische Analysemethoden erleichtert. Die minimalen Metabolitflüsse verschiedener Simulationen können nun paarweise in Diagrammen gegenübergestellt werden, um so signifikante Unterschiede zu ermitteln. Außerdem wird die elementzentrische Analyse von Modellflüssen ermöglicht, wodurch die Visualisierung von *in silico* Kohlenstoffflüssen und damit einhergehend die Charakterisierung des Stoffwechsels vereinfacht wird.

Die entwickelte Modellierungsplattform wurde dazu verwendet, die metabolischen Modelle der thermophilen Prokaryoten *Thermus thermophilus* HB27 und *Sulfolobus solfataricus* P2 zu ergänzen und den Katabolismus dieser Organismen für verschiedene Kohlenstoffquellen detailliert zu charakterisieren.

Das metabolische Modell von *T. thermophilus* HB27 [73] wurde in dieser Arbeit erfolgreich erweitert, anhand experimenteller Daten validiert und in Abhängigkeit von Temperatur und Kohlenstoffquelle charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die vorhergesagten Kohlenstoffflüsse beim modellierten Wachstum auf Glucose-Minimalmedium mit experimentellen ¹³C-Analysen übereinstimmen.

Das Modell wurde weiterhin um temperaturabhängige Parameter ergänzt, wodurch tendenzielle Veränderungen der Wachstumsrate und des Verbleibs von Kohlenstoff für zwei unterschiedliche Wachstumstemperaturen korrekt vorhergesagt werden können.

Beim modellierten Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen wurden Ansatzpunkte für metabolische Optimierung identifiziert. So wird vorhergesagt, dass der temperaturabhängige Rückstrom von Protonen durch die Zellmembran bis zu 88 % der wachstumsunabhängigen Energiekosten verursacht. Für die Substrate Glycerol, Succinat und Phenylacetat werden vom Modell außerdem sehr hohe Sauerstoffaufnahmeleistungen berechnet, was darauf hindeutet, dass das Wachstum auf diesen Substraten stark von der Verfügbarkeit gelösten Sauerstoffs abhängig ist. Zudem wird für die Kohlenstoffquellen Phenylacetat und 3-Hydroxybutanoat ein interner Überschuss an NADPH vorausgesagt, welcher nicht ohne Energieverlust zu NADH umgewandelt werden kann.

Das metabolische Modell von *S. solfataricus* P2 [92] wurde im Rahmen dieser Arbeit umfassend erweitert und hat wesentlich zur Aufklärung der Abbauewege verschiedener Kohlenstoffquellen im Organismus beigetragen.

Es konnte die Hypothese aufgestellt und später bestätigt werden, dass der Abbau von L-Fucose in *S. solfataricus* Aldolase-abhängig unter Bildung des Intermediats 2-Keto-3-deoxy-L-Fuconat erfolgt. Weiterhin wurde gezeigt, dass in *S. solfataricus* der Abbau verzweigtkettiger und aromatischer Aminosäuren über oxidative Stickland-Reaktionen zur ATP-Produktion und damit zu einem optimalen Biomassefluss beiträgt. Über diese Reaktionen werden ausschließlich 2-Ketosäuren als Endprodukte produziert, welche nicht weiter verstoffwechselt werden können. Dies erklärt, warum Letztere vom Organismus exportiert werden und warum der *S. solfataricus* nicht in der Lage ist, die genannten Aminosäuren als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Ein phylogenetischer Vergleich auf Grundlage von Proteinsequenzen ergab, dass die einzigen obligat aeroben Prokaryoten, die Enzyme für oxidative Stickland-Reaktionen besitzen, Archaeen aus der Familie Sulfolobaceae sind.

Die Charakterisierung des Katabolismus für verschiedene Kohlenstoffquellen zeigte, dass in *S. solfataricus* alternative Stoffwechselwege für die Synthese von Kohlenhydraten und Reduktionsäquivalenten vorhanden sind. So besteht durch die Präsenz des verzweigten Entner-Doudoroff-Wegs sowie mehrerer Enzyme mit

dualer Kofaktor-Spezifität im Citratzyklus eine hohe Variabilität bezüglich der Regeneration der Reduktionsäquivalente NADH und NADPH. Dies erklärt, warum der Organismus keine dedizierten Stoffwechselwege zur Synthese von NADPH besitzt. Es wurde zudem festgestellt, dass die Synthese von C₄-Körpern auch durch Abschnitte eines Kohlenstoff-Fixierzyklus erfolgen kann. Dieser stellt somit eine effiziente Alternative zum Glyoxylat-Shunt oder anaplerotischen Reaktionen dar.

Es konnte außerdem bestätigt werden, dass der semi-phosphorylierende Entner-Doudoroff-Weg beim modellierten Wachstum auf Glucose nur eine untergeordnete Rolle für die Gluconeogenese besitzt.

Die entwickelte Modellierungsplattform bietet durch neue graphische Analysemethoden die Möglichkeit, metabolische Netzwerke effizient zu charakterisieren. Durch die Entwicklung einer grafischen Benutzeroberfläche kann die Verbreitung dieser Plattform in Zukunft verbessert und die Kenntnisschwelle, die für die Nutzung der Software nötig ist, verringert werden.

Durch die gezielte Untersuchung vorhergesagter Kohlenstoffflüsse wurden in *T. thermophilus* Möglichkeiten zur Optimierung der Wachstumsraten entdeckt und in *S. solfataricus* alternative Stoffwechselwege für die Synthese von Kohlenhydraten und Reduktionsäquivalenten identifiziert. Die beiden in dieser Arbeit erweiterten metabolischen Modelle thermophiler Prokaryoten sind nun die umfangreichsten ihrer Art und sind daher am besten geeignet den Stoffwechsel thermophiler Bakterien und Archaeen *in silico* zu untersuchen. Die Integration temperaturabhängiger Parameter hat die Qualität der Modellvorhersagen verbessert und trägt zu einem besseren Verständnis der Herausforderungen einer thermophilen Lebensweise bei.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Mentor Prof. Dr. Dietmar Schomburg für die Möglichkeit bedanken, an einem vielschichtigen und interessantem Themengebiet zu arbeiten. Durch die Zeit in seiner Arbeitsgruppe und seine ehrliche, konstruktive Leitung habe ich viele wertvolle Erfahrungen sammeln können.

Prof. Dr. Dieter Jahn danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Prof. Dr. Karsten Hiller für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Alexander Riemer für die vielen Ratschläge bei zahlreichen Modellierungsfragen.

Mein Dank gilt ebenso Jacqueline Wolf, Katrin Müller und Carolin Nienhagen für die Bereitstellung ihrer experimentellen Ergebnisse. Besonders Jacqueline Wolf und Meina Neumann-Schaal möchte ich zudem für die enge und erfolgreiche Zusammenarbeit sowie die Unterstützung beim Verfassen von Publikationen danken.

Außerdem möchte ich mich bei Sandra Placzek, Lisa Jeske, Marcus Ulbrich, Antje Chang und Ida Schomburg für die tollen Jahre rund um das BRENDA-Team sowie die vielen Ratschläge und Korrektur bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe Schomburg danke ich für die angenehmen Arbeitsatmosphäre und die offene Zusammenarbeit. Gerade die letzte Zeit im BRICS, in der sich alle öfter gesehen haben, wird mir im Gedächtnis bleiben.

Ganz besonders möchte ich auch meiner Partnerin Jacqueline Hermann danken, dass sie immer an mich geglaubt und mich fortwährend motiviert hat. Auch danke ich ihr für ihre Engelsgeduld während des Schreibens dieser Arbeit, da es bestimmt oft nicht leicht mit mir war.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für ihre andauernde Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung danken.

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BTM	Biotrockenmasse
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CPU	Prozessor
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
FBA	Flux Balance Analysis
FVA	Flux Variability Analysis
FVA₁₀₀	Optimale FVA (Biomassefluss auf Optimum festgesetzt)
FVA₉₅	Suboptimale FVA (95 % des optimalen Biomasseflusses erlaubt)
GAM	Wachstumsassoziierte Energiekosten (engl.: <i>growth-associated maintenance energy</i>)
H₂O	Wasser
HCO₃⁻	Hydrogencarbonat
HP/HB-Zyklus	3-Hydroxypropionat-/4-Hydroxybutyrat-Zyklus
ID	Identifikator
KD(P)G Aldolase	2-Keto-3-deoxygluconat-Aldolase
KDF	2-Keto-3-deoxy-L-Fuconat
KDG	2-Keto-3-deoxygluconat
KDPG	2-Keto-3-deoxyphosphogluconat
Kohlenstoffbilanz	Relativer Einbau des Kohlenstoffs aus der Kohlenstoffquelle in die Biomasse
MFM	Metabolitfluss-Minimierung
MOMA	Minimisation Of Metabolic Adjustment
NAD⁺	Nicotinamadeninindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamadeninindinukleotid (reduziert)
NADP⁺	Nicotinamadeninindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamadeninindinukleotidphosphat (reduziert)
NGAM	Wachstumsunabhängige Energiekosten (engl.: <i>non-growth-associated maintenance energy</i>)
npED	Nicht-phosphorylierender Entner-Doudoroff-Weg
O₂	Sauerstoff
P/O-Verhältnis	Phosphor-Sauerstoff-Verhältnis
PEP	Phosphoenolpyruvat
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PPP	Pentose-Phosphat-Weg
SBML	Systems Biology Markup Language
spED	Semi-phosphorylierender Entner-Doudoroff-Weg
TKAPA	Tetrakis-(3-aminopropyl)-ammonium

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des Ansatzes zu iterativen Verbesserung systembiologischer Modelle.	2
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Kompartimente eines stöchiometrischen Modells.	3
Abbildung 3:	Darstellungsformen stöchiometrischer, metabolischer Modelle.	9
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der einschränkungs-basierten Modellierung.	11
Abbildung 5:	Notwendige Schritte zur Optimierung der Flüsse eines metabolischen Modells mittels Flux Balance Analysis (FBA).	18
Abbildung 6:	Darstellung mehrerer optimaler Lösungen während der einschränkungs-basierten Modellierung.	20
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der Minimization Of Metabolic Adjustment (MOMA).	21
Abbildung 8:	Schematische Darstellung eines thermodynamisch verbotenen Kreislaufs.	22
Abbildung 9:	Übersicht der wichtigsten Skripte und Klassen sowie deren Abhängigkeiten innerhalb der Modellierungsplattform.	34
Abbildung 10:	Tabellenstruktur der Modellierungsplattform.	36
Abbildung 11:	Tabellenstruktur der Metabolit-Datenbank.	39
Abbildung 12:	Vergleich von minimalen Metabolitflüssen zwischen zwei Simulationen.	45
Abbildung 13:	Elementzentrische Analyse des Kohlenstoffs beim modellierten Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 auf Glucose.	48
Abbildung 14:	Elementzentrische Analyse des Schwefels beim modellierten Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 auf Glucose.	49
Abbildung 15:	Aktualisiertes Schema der Atmungskette in <i>T. thermophilus</i> .	51
Abbildung 16:	Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse an den metabolischen Verzweigungspunkten D-Fructose-6-phosphat, D-Glyceraldehyd-3-phosphat und 3-Phospho-D-Glycerat im Modell von <i>T. thermophilus</i> HB27 für das Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.	61

Abbildung 17:	Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse an den metabolischen Verzweigungspunkten Pyruvat und Acetyl-CoA im Modell von <i>T. thermophilus</i> HB27 für das Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.	62
Abbildung 18:	Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse an den metabolischen Verzweigungspunkten Dihydroxyacetonphosphat, 3-Phospho-D-glycerat und Pyruvat im Modell von <i>T. thermophilus</i> HB27 für das Wachstum auf Glycerol als alleiniger Kohlenstoffquelle.	69
Abbildung 19:	Vergleich der mittels suboptimaler FVA ermittelten signifikant veränderten Reaktionsflüsse beim modellierten Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 auf den alleinigen Kohlenstoffquellen Glucose und Glycerol.	73
Abbildung 20:	Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse im Modell von <i>T. thermophilus</i> HB27 für das Wachstum auf Succinat als alleiniger Kohlenstoffquelle.	76
Abbildung 21:	Vergleich der mittels suboptimaler MFM ermittelten signifikant veränderten Metabolitflüsse beim modellierten Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 auf den alleinigen Kohlenstoffquellen Glucose und Succinat.	80
Abbildung 22:	Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse im Modell von <i>T. thermophilus</i> HB27 für das Wachstum auf Phenylacetat als alleiniger Kohlenstoffquelle.	82
Abbildung 23:	Vergleich der mittels suboptimaler FVA ermittelten signifikant veränderten Reaktionsflüsse beim modellierten Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 auf den alleinigen Kohlenstoffquellen Glucose und Phenylacetat.	88
Abbildung 24:	Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse im Modell von <i>T. thermophilus</i> HB27 für das Wachstum auf 3-Hydroxybutanoat als alleiniger Kohlenstoffquelle.	90
Abbildung 25:	Vergleich der mittels suboptimaler MFM ermittelten signifikant veränderten Metabolitflüsse beim modellierten Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 auf den alleinigen Kohlenstoffquellen Glucose und 3-Hydroxybutanoat.	95

Abbildung 26:	Vergleich der vorhergesagten Aufspaltung von Kohlenstoffflüssen im Modell von <i>T. thermophilus</i> HB27 für das Wachstum bei 70 °C und 80 °C an den metabolischen Verzweigungspunkten Phospho-enolpyruvat, Pyruvat und Acetyl-CoA.	99
Abbildung 27:	Einordnung der Reaktionen des metabolischen Modells von <i>S. solfataricus</i> P2 in Stoffwechselkategorien.	104
Abbildung 28:	Übersicht über den Zentralstoffwechsel von <i>S. solfataricus</i> P2 für das Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.	112
Abbildung 29:	Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse im verzweigten Entner-Doudoroff-Weg von <i>S. solfataricus</i> P2 für das Wachstum auf Glucose und Lactose als alleiniger Kohlenstoffquelle.	114
Abbildung 30:	Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse in <i>S. solfataricus</i> P2 für das Wachstum auf Mannose als alleiniger Kohlenstoffquelle.	119
Abbildung 31:	Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse in <i>S. solfataricus</i> P2 für das Wachstum auf Acetoin als alleiniger Kohlenstoffquelle.	124
Abbildung 32:	Vergleich der mittels suboptimaler MFM ermittelten signifikant veränderten Metabolitflüsse beim modellierten Wachstum von <i>S. solfataricus</i> P2 auf den alleinigen Kohlenstoffquellen Glucose und Acetoin.	126
Abbildung 33:	Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse in <i>S. solfataricus</i> P2 für das Wachstum auf Phenol als alleiniger Kohlenstoffquelle.	130
Abbildung 34:	Vergleich der mittels suboptimaler MFM ermittelten signifikant veränderten Metabolitflüsse beim modellierten Wachstum von <i>S. solfataricus</i> P2 auf den alleinigen Kohlenstoffquellen Glucose und Phenol.	132
Abbildung 35:	Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse in <i>S. solfataricus</i> P2 für das Wachstum auf L-Arabinose als alleiniger Kohlenstoffquelle.	136

Abbildung 36:	Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoffflüsse in <i>S. solfataricus</i> P2 für das Wachstum auf D-Arabinose als alleiniger Kohlenstoffquelle.	137
Abbildung 37:	Vergleich der mittels suboptimaler MFM ermittelten signifikant veränderten Metabolitflüsse beim modellierten Wachstum von <i>S. solfataricus</i> P2 auf den alleinigen Kohlenstoffquellen D-Arabinose und L-Arabinose.	141
Abbildung 38:	Übersicht über die bekannten Abbauwege für L-Fucose in <i>X. campestris</i> und <i>E. coli</i> sowie über den postulierten Abbauweg für L-Fucose in <i>S. solfataricus</i> P2.	143
Abbildung 39:	Vorhergesagte Aufspaltung der Kohlenstoff-flüsse in <i>S. solfataricus</i> P2 für das Wachstum auf L-Fucose als alleiniger Kohlenstoff-quelle.	150
Abbildung 40:	Schema des Abbaus von Aminosäuren über oxidative Stickland-Reaktionen in Archaeen.	154
Abbildung 41:	Katabolismus der verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin im metabolischen Modell von <i>S. solfataricus</i> P2.	156
Abbildung 42:	Katabolismus der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin im metabolischen Modell von <i>S. solfataricus</i> P2.	157

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Kombinierbare Szenarioparameter der Modellierungsplattform.	41
Tabelle 2:	Komfort-Funktionen der Modellierungsplattform für die Erstellung von Szenarien.	42
Tabelle 3:	Aktualisierte Biomassezusammensetzung von <i>T. thermophilus</i> HB27 für das Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.	52
Tabelle 4:	Unterschiede im Umfang verschiedener Modelle von <i>Thermus thermophilus</i> HB27.	53
Tabelle 5:	Unterschiede in der Biomassezusammensetzung für das Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 bei unterschiedlichen Temperaturen.	54
Tabelle 6:	Vergleich von Modellvorhersagen mit zur Verfügung gestellten experimentellen Daten bezüglich des Wachstums von <i>T. thermophilus</i> HB27 auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.	58
Tabelle 7:	Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle für das Ausgangsmodell und den aktuellen Modellstand.	65
Tabelle 8:	Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 auf Glucose und Glycerol als alleiniger Kohlenstoffquelle.	71
Tabelle 9:	Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 auf Glucose und Succinat als alleiniger Kohlenstoffquelle.	78
Tabelle 10:	Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 auf Glucose und Phenylacetat als alleiniger Kohlenstoffquelle.	85
Tabelle 11:	Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 auf Glucose und 3-Hydroxybutanoat als alleiniger Kohlenstoffquelle.	93

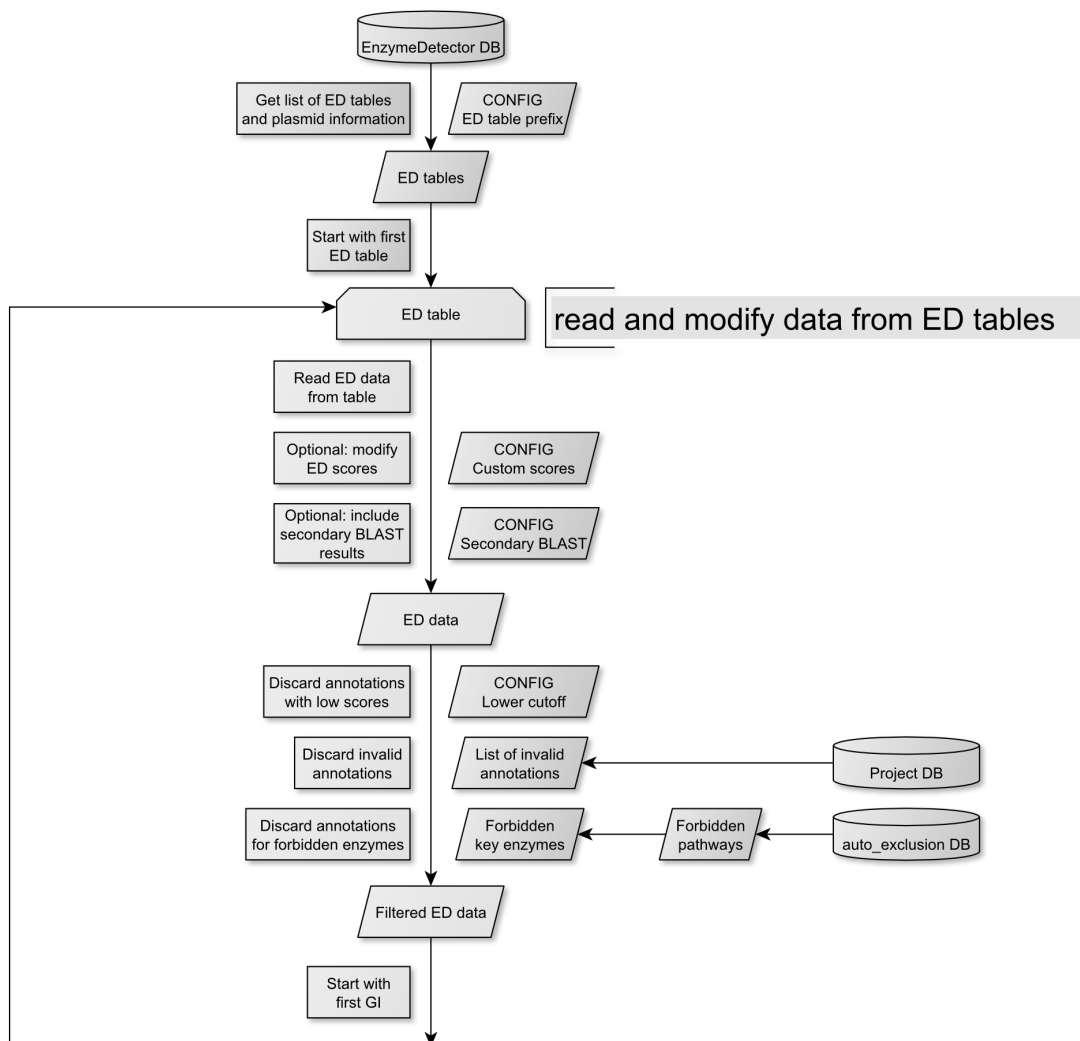
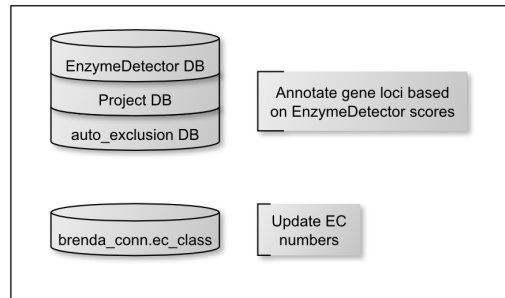
Tabelle 12:	Vorhergesagte Biomasseflüsse und Integration von Kohlenstoff in Biomasse (Kohlenstoffbilanzen) für das Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 bei unterschiedlichen Temperaturen.	96
Tabelle 13:	Übersicht über die vom metabolischen Modell vorhergesagte Verteilung von Kohlenstoff und Energie für das Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 bei 70 °C und 80 °C.	97
Tabelle 14:	Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von <i>T. thermophilus</i> HB27 bei 70 °C und 80 °C auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.	101
Tabelle 15:	Aktueller Umfang des Modells von <i>S. solfataricus</i> P2.	103
Tabelle 16:	Biomassezusammensetzung im Modell von <i>S. solfataricus</i> P2 für das Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.	106
Tabelle 17:	Biomasseanteile von DNA, RNA und Proteine für das Wachstum von <i>S. solfataricus</i> P2 auf L-Fucose, Caseinhydrolysat oder Phenol als alleiniger Kohlenstoffquelle.	106
Tabelle 18:	Vergleich von Modellvorhersagen mit zur Verfügung gestellten experimentellen Daten bezüglich des Wachstums von <i>S. solfataricus</i> P2 auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.	109
Tabelle 19:	Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von <i>S. solfataricus</i> P2 auf Glucose, Lactose und Mannose als alleiniger Kohlenstoffquelle.	121
Tabelle 20:	Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von <i>S. solfataricus</i> P2 auf Acetoin und Phenol als alleiniger Kohlenstoffquelle.	127
Tabelle 21:	Vergleichende Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von <i>S. solfataricus</i> P2 auf L- und D-Arabinose als alleiniger Kohlenstoffquelle.	139
Tabelle 22:	Für das Modell von <i>S. solfataricus</i> P2 eingestellte NGAM-Werte für verschiedene getestete Varianten des Abbaus von L-Fucose.	145
Tabelle 23:	Mögliche Aktivitäten von experimentell nachgewiesenen Metaboliten im Modell von <i>S. solfataricus</i> beim modellierten Wachstum auf Glucose und L-Fucose.	147

Tabelle 24:	Maximal mögliche Flüsse durch ausgewählte Stoffwechselwege beim modellierten Wachstum von <i>S. solfataricus</i> P2 auf L-Fucose.	149
Tabelle 25:	Split-ratio Analyse der Metabolite ATP, NADH und NADPH für das simulierte Wachstum von <i>S. solfataricus</i> P2 auf L-Fucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.	152
Tabelle 26:	Aufnahmeraten und vorhergesagte Abbauwege für Aminosäuren im metabolischen Modell von <i>S. solfataricus</i> P2.	159
Tabelle 27:	Anteile ATP produzierender Stoffwechselwege beim modellierten Wachstum von <i>S. solfataricus</i> P2 auf Caseinhydrolysat als alleiniger Kohlenstoffquelle.	162

Anhang

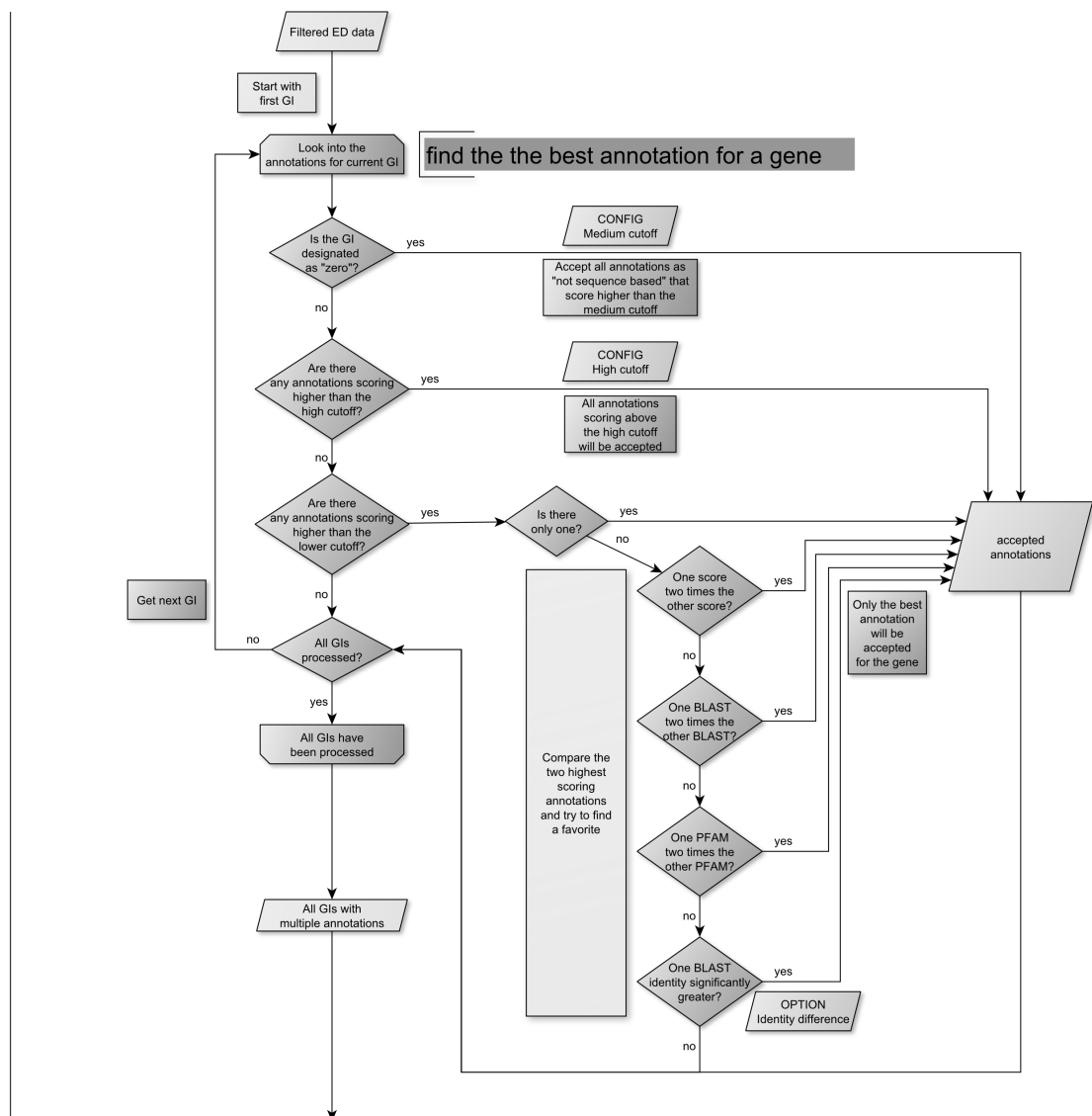
Anhang 1:	Fließschema des Skriptes BRannotate.py zur automatisierten Zuordnung von Genen zu Enzymen (Teil 1).	177
Anhang 2:	Fließschema des Skriptes BRannotate.py zur automatisierten Zuordnung von Genen zu Enzymen (Teil 2).	178
Anhang 3:	Fließschema des Skriptes BRannotate.py zur automatisierten Zuordnung von Genen zu Enzymen (Teil 3).	179
Anhang 4:	Zuordnung der Abkürzungen in Reaktionsnamen zu Stoffwechselwegen der in dieser Arbeit verwendeten metabolischen Modelle.	180
Anhang 5:	Vom Ausgangsmodell von <i>T. thermophilus</i> HB27 für das Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen vorhergesagte Wachstumsraten.	184
Anhang 6:	Vom Ausgangsmodell von <i>S. solfataricus</i> P2 vorhergesagte Kohlenstoffquellen und relative Wachstumsraten.	185
Anhang 7:	Liste aller Archaeen mit den für oxidative Stickland-Reaktionen notwendigen Enzymen.	186
Anhang 8:	Zugriff auf die Modellierungsplattform zu Testzwecken.	191

required databases or tables



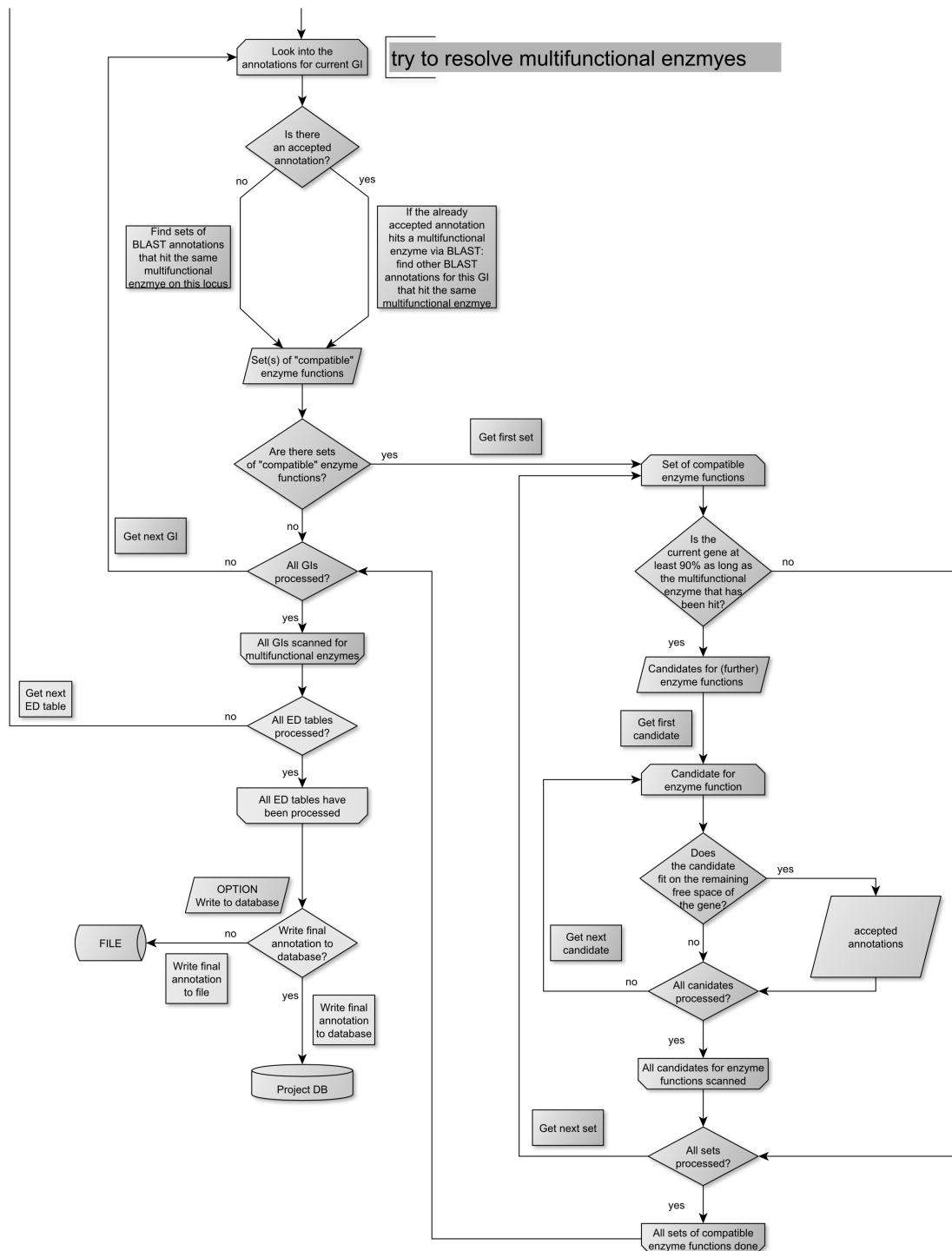
Anhang 1: Fließschema des Skriptes BRannotate.py zur automatisierten Zuordnung von Genen zu Enzymen (Teil 1).

Das Fließschema ist in englischer Sprache verfasst und besteht aus drei Teilen.



Anhang 2: Fließschema des Skriptes BRannotate.py zur automatisierten Zuordnung von Genen zu Enzymen (Teil 2).

Das Fließschema ist in englischer Sprache verfasst und besteht aus drei Teilen.



Anhang 3: Fließschema des Skriptes BRannotate.py zur automatisierten Zuordnung von Genen zu Enzymen (Teil 3).

Das Fließschema ist in englischer Sprache verfasst und besteht aus drei Teilen.

Anhang 4: Zuordnung der Abkürzungen in Reaktionsnamen zu Stoffwechselwegen der in dieser Arbeit verwendeten metabolischen Modelle.

Reaktionen können mehreren Stoffwechselwegen zugeordnet sein.

Abkürzungen	Stoffwechselweg	Anzahl Reaktionen	
		<i>T. thermophilus</i>	<i>S. solfataricus</i>
aa	Aminosäure-Biosynthese	103	100
ABC-transporter	Aktiver ABC Transporter	57	37
acetylcoa	Oxidative Decarboxylierung	3	1
acp	Acyl-Carrier-Protein-Stoffwechsel	1	0
ala	Alanin-Stoffwechsel	2	1
aminoprop	Aminopropanolphosphat-Biosynthese	2	2
anap	Anaplerotische und kataplerotische Reaktionen	6	4
antiporter	Ionen-Protonen Antiporter	2	10
archaeosine	Archaeosin-Biosynthese	0	6
arg	Arginin-Stoffwechsel	11	9
arsenic	Arsenat-Detoxifizierung	1	0
asn	Asparagin-Stoffwechsel	3	3
asp	Aspartat-Stoffwechsel	2	1
beta-ala	β -Alanin-Biosynthese	3	5
biotin	Biotin-Biosynthese	8	4
cac	Citratzyklus	11	11
carb	Kohlenhydrat-Stoffwechsel	204	254
carbam	Carbamat-Biosynthese	0	1
carbon-fixation	Fixierung von Kohlenstoff über den 3-Hydroxypropionat-/4-Hydroxybutyrat-Zyklus	0	21
carotenoids	Carotinoid-Stoffwechsel	14	5
cdp-diacylglycerol	CDP-Diacylglycerol-Biosynthese	4	0
coa	Coenzyme A-Biosynthese	9	13
cobalamin	Cobalamin-Biosynthese	15	23
cobalamin-anaerobic	Cobalamin-Biosynthese (anaerob)	11	11
cof	Kofaktor-Biosynthese	132	122
conversion	Umwandlung zwischen CO ₂ und Hydrogencarbonat	0	1
cys	Cysteine-Stoffwechsel	5	5
de-novo	<i>De-novo</i> Synthese von Nukleotiden	23	28
degra	Abbauege (Katabolismus)	148	153

Abkürzungen	Stoffwechselweg	Anzahl Reaktionen	
		<i>T. thermophilus</i>	<i>S. solfataricus</i>
dpucp	Ditrans,octakis-undecaprenylphosphat-Biosynthese	5	0
entner	Entner-Doudoroff-Weg	4	25
envelope	Biosynthese von Bestandteilen der Zellhülle (Zellwand und Membran)	48	0
eps	Exopolysaccharide-Biosynthese	0	4
f420	Biosynthese des F420-Kofaktors	0	5
fatty	Fettsäure-Stoffwechsel	20	0
fatty-beta-ox	Fettsäure-Oxidation	34	0
fatty-branched	Biosynthese verzweigtkettiger Fettsäuren	9	0
fatty-elong	Fettsäure-Elongation	79	0
fatty-init	Initiation der Fettsäure-Biosynthese	4	0
fatty-salvage	Rückgewinnung von Fettsäuren	7	0
fe-s-cluster	Biosynthese von Fe-S-Clustern	7	0
flavin	Biosynthese von Flavinen	11	11
flux	Austauschreaktion	71	78
fol	Folat-Stoffwechsel	8	0
galactose	Galactose-Biosynthese	0	3
gdp-mann / gdp-mannose	GDP-mannose-Biosynthese	3	2
gln	Glutamin-Stoffwechsel	1	1
glu	Glutamat-Stoffwechsel	3	2
glucneo	Gluconeogenesis	2	13
gly	Glycin-Stoffwechsel	5	4
glyc	Glykolyse	15	0
glycogen	Glykogen-Biosynthese	2	5
glyox	Glyoxylat-Shunt	2	2
hcys	Homocystein-Biosynthese	7	5
heme	Häm-Biosynthese	7	0
his	Histidin-Stoffwechsel	10	10
hser	Homoserin-Biosynthese	5	4
hydrolysis	Hydrolyse-Reaktionen	0	2
ile	Isoleucin-Stoffwechsel	4	8
iron	Eisen-Stoffwechsel	1	0

Abkürzungen	Stoffwechselweg	Anzahl Reaktionen	
		<i>T. thermophilus</i>	<i>S. solfataricus</i>
isoprenoids	Isoprenoid-Biosynthese	0	12
leu	Leucin-Stoffwechsel	8	8
lipids	Lipid-Stoffwechsel	4	31
lys	Lysin-Stoffwechsel	10	10
mannosylglyc	Mannosylglycerate-Biosynthese	2	0
menaquinol	Menachinol-Biosynthese	4	0
menaquinol-8	Menachinol-8-Biosynthese	3	0
met	Methionine-Stoffwechsel	9	18
met-salvage	Methionin-Rückgewinnung	6	0
metherythphos	Methylerythritolphosphat-Weg	10	0
methylmalonyl	Methylmalonyl-Weg	2	0
moco	Molybdän-Kofaktor-Biosynthese	6	0
msec	Selenomethylselenocystein-Stoffwechsel	1	0
multiple-pathways	Nicht-manuell eingeordnet: in mehreren Stoffwechselwegen involviert	37	8
myo-inositol	Myo-Inositol-Stoffwechsel	6	2
nad	NAD-Biosynthese	8	16
no-pathway	Nicht-manuell eingeordnet: kein Stoffwechselweg hinterlegt	65	63
nuc	Nucleotid-Stoffwechsel	116	147
orn	Ornithin-Stoffwechsel	7	5
other	Nicht-manuell eingeordnet	129	92
oxp	Oxidative Phosphorylierung / Respiration	6	5
pant	Pantoat-Biosynthese	3	0
pepglyc	Peptidoglycan-Biosynthese	13	0
pha	Polyhydroxyalkanoat-Biosynthese	9	0
phe	Phenylalanin-Stoffwechsel	5	11
plp	Pyridoxalphosphat-Biosynthese	1	2
polyamines	Polyamin-Biosynthese	8	9
ppGpp	Guanosin-3'-diphosphat-5'-diphosphat-Biosynthese	4	0
ppp	Pentose-Phosphat-Weg	11	5
pro	Prolin-Stoffwechsel	5	2
prot	Protonierungsreaktion	0	30

Abkürzungen	Stoffwechselweg	Anzahl Reaktionen	
		<i>T. thermophilus</i>	<i>S. solfataricus</i>
prpp	Phospho- α -D-Ribosediphosphat-Biosynthese	1	1
purin	Purin-Stoffwechsel	57	81
pyrim	Pyrimidin-Stoffwechsel	55	61
redox	Redoxreaktionen	11	10
rump	Reverser Ribulosemonophosphat-Weg	0	2
rhamnose	Rhamnose-Biosynthese	0	5
rhamnolipids	Rhamnolipid-Biosynthese	7	0
salvage	Rückgewinnung-Stoffwechselwege	38	63
sam	S-Adenosyl-L-methionin-Stoffwechsel	3	3
scwp	Biosynthese sekundärer Zellwandpolymere	6	0
sec	Selenocystein-Stoffwechsel	8	3
ser	Serin-Stoffwechsel	3	3
shiki	Shikimat-Weg	7	8
sink	artifizielle Austauschreaktion	5	7
siroheme	Sirohäm-Biosynthese	2	0
special-quinones	Biosynthese der <i>Sulfolobus</i> -spezifischen Chinone	0	9
spontaneous	spontane Reaktion	25	31
sulf	Schwefel-Stoffwechsel	8	5
sulfopterin	Sulfopterin-Biosynthese	0	8
superoxide / superoxide-radicals	Superoxidradikale-Stoffwechsel	7	5
symporter	Eisen-Symporter	1	23
T	Grenz-Reaktion	150	166
terpene	Terpen-Biosynthese	0	2
tetrahydrosulfopterin	Tetrahydrosulfopterin-Biosynthese	0	7
tetrapyrrole	Tetrapyrrol-Biosynthese	5	6
thermozeaxanthin	Thermozeaxanthin-Biosynthese	15	0
thfa	Tetrahydrofolat-Biosynthese	11	0
thiamin	Thiamin-Biosynthese	15	18
thr	Threonin-Stoffwechsel	7	6
trans	passiver Transporter	14	11
trehalose	Trehalse-Stoffwechsel	0	6
tRNA	tRNA-Stoffwechsel	25	21

Abkürzungen	Stoffwechselweg	Anzahl Reaktionen	
		<i>T. thermophilus</i>	<i>S. solfataricus</i>
trp	Tryptophan-Stoffwechsel	9	17
tyr	Tyrosin-Stoffwechsel	4	10
udp-glcnac	UDP- α -N-acetyl-D-Glucosamin-Biosynthese	8	0
udp-murnac	UDP-N-Acetylmuramate-Biosynthese	2	0
ureacyc	Harnstoffzyklus	4	4
val	Valin-Stoffwechsel	4	4

Anhang 5: Vom Ausgangsmodell von *T. thermophilus* HB27 für das Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen vorhergesagte Wachstumsraten.

Substrat	Biomassefluss [h ⁻¹]
Glucose	0,156
Succinat	0,079
Glycerol	0,175
Phenylacetat	0,121
3-Hydroxybutanoat	0,130

Erhöhtes Wachstum			Ähnliches Wachstum			Vermindertes Wachstum		
Kohlenstoffquelle	Biomasse	Veränderung der Biomasse (% zu Glucose)	Kohlenstoffquelle	Biomasse	Veränderung der Biomasse (% zu Glucose)	Kohlenstoffquelle	Biomasse	Veränderung der Biomasse (% zu Glucose)
Glycerol	0,0117	175,17	Xylose	0,0073	109,99	Citrat	0,0058	87,46
Propanol	0,0083	125,02	Xylan	0,0073	109,99	Lactat	0,0058	87,40
Raffinose	0,0082	122,42	D-Arabinose	0,0073	109,99	Alanin	0,0058	87,40
N-acetyl-glutamat	0,0080	119,73	Arabinan	0,0073	109,99	L-Arabinose	0,0053	79,90
Melibiose	0,0079	117,77	Mannose	0,0070	104,76	Malat	0,0052	78,02
Lactose	0,0079	117,77	Galactose	0,0070	104,76	Acetoin	0,0052	78,02
Glutamat	0,0078	117,51	Glycogen	0,0067	100,54	Pyruvat	0,0042	62,33
Trehalose	0,0075	112,48	Glucose	0,0067	100,00	Tartarat	0,0040	59,21
Maltose	0,0075	112,48	Dextrin	0,0067	100,00	Ethanol	0,0033	49,80
Maltodextrin	0,0075	112,41	Fructose	0,0067	100,00	Phenol	0,0017	24,75
Sucrose	0,0075	112,41	Succinat	0,0065	96,83	Cytosin	0,0015	22,39
Cellulose	0,0075	112,41						
Cellobiose	0,0075	112,41						

Anhang 6: Vom Ausgangsmodell von *S. solfataricus* P2 vorhergesagte Kohlenstoffquellen und relative Wachstumsraten.

Die einzelnen Kohlenstoffquellen wurden auf $1 \text{ mmol C} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ normiert. Die Ergebnisse sind in die drei Kategorien: „erhöhtes Wachstum“, „ähnliches Wachstum“ und „vermindertes Wachstum“ eingeteilt [118].

Anhang 7: Liste aller Archaeen mit den für oxidative Stickland-Reaktionen notwendigen Enzymen.

Mittels der Proteinsequenzen der für oxidative Stickland-Reaktionen notwendigen Enzyme aus dem Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* (UniProt: Q97XD9, Q97V78, Q97WQ2) und dem Euryarchaeon *Pyrococcus furiosus* (UniProt: E7FI45, Q51801, Q8U3D5) wurde nach Homologen in anderen Archaeen gesucht. Positive Ergebnisse (e-Value < 10^{-20}) werden durch eine „+“ und negative Ergebnisse (e-Value > 10^{-20}) durch ein „-“ gekennzeichnet. Aufgelistet sind alle Organismen, für die mindestens eine Oxidoreduktase und die Acetat-CoA-Ligase annotiert werden können.

ACS: Acetat-CoA-Ligase (EC 6.2.1.13); BC-OR: Ketoisovalerat-Oxidoreduktase (EC 1.2.7.7); AR-OR: Indolpyruvat-Oxidoreduktase (EC 1.2.7.8).

Organismus	ACS Pfu	BC-OR Pfu	AR-OR Pfu	ACS Sso	BC-OR Sso	AR-OR Sso
<i>Acidianus hospitalis</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Acidilobus saccharovorans</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Aciduliprofundum boonei</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Aciduliprofundum sp. mar08-339</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Archaeoglobus profundus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Archaeoglobus sulfaticallidus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Archaeoglobus veneficus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Caldisphaera lagunensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Caldivirga maquilingensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Caldivirga sp. mu80</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Candidatus acidianus copahuensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Candidatus korarchaeum cryptofilum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Candidatus methanomassiliicoccus intestinalis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Candidatus methanomethylophilus alvus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Candidatus methanomethylophilus sp. 1r26</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Candidatus methanoperedens nitroreducens</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Candidatus methanoplasma termitum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Cuniculiplasma divulgatum</i>	+	-	+	+	-	+
<i>Desulfurococcus amylolyticus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Desulfurococcus fermentans</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Desulfurococcus kamchatkensis</i>	+	+	+	+	+	+

Organismus	ACS Pfu	BC-OR Pfu	AR-OR Pfu	ACS Sso	BC-OR Sso	AR-OR Sso
<i>Ferroglobus placidus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	+	-	+	+	-	+
<i>Geoglobus acetivorans</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Geoglobus ahangari</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Halanaeroarchaeum sulfurireducens</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Halapricum salinum</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Halorhabdus tiamatea</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Halorhabdus utahensis</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Hyperthermus butylicus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Ignicoccus hospitalis</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Ignicoccus islandicus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Metallosphaera cuprina</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Metallosphaera sedula</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Metallosphaera yellowstonensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobacterium congolense</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobacterium formicicum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobacterium lacus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobacterium paludis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobacterium sp. a39</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobacterium sp. mb1</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobacterium sp. sma-27</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobrevibacter boviskoreani</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobrevibacter curvatus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobrevibacter millerae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobrevibacter olleyae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobrevibacter oralis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobrevibacter sp. a27</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobrevibacter sp. abm4</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobrevibacter sp. ye315</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobrevibacter wolinii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanocaldococcus bathoardescens</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Methanocaldococcus fervens</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Methanocaldococcus infernus</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Methanocaldococcus sp. fs406- 22</i>	+	+	-	+	+	-

Organismus	ACS Pfu	BC-OR Pfu	AR-OR Pfu	ACS Sso	BC-OR Sso	AR-OR Sso
<i>Methanocaldococcus villosus</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Methanocaldococcus vulcanius</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Methanocella arvoryzae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanocella conradii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanococcoides burtonii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanococcoides methylutens</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanococcus aeolicus</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Methanococcus maripaludis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanococcus vannielii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanococcus voltae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanocorpusculum bavaricum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanoculleus bourgensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanoculleus horonobensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanoculleus marisnigri</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanoculleus sediminis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanoculleus sp. mab1</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanoculleus sp. mh98a</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanoculleus thermophilus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanofollis ethanolicus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanofollis liminatans</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanogenic archaeon iso4-h5</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanogenium cariaci</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Methanohalobium evestigatum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanohalophilus halophilus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanohalophilus mahii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanohalophilus portucalensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanolacinia paynteri</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanolacinia petrolearia</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanolinea tarda</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanolobus psychrophilus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanolobus tindarius</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanomethylovorans hollandica</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanomicrobium mobile</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanoplanus limicola</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanoregula boonei</i>	+	+	+	+	+	+

Organismus	ACS Pfu	BC-OR Pfu	AR-OR Pfu	ACS Sso	BC-OR Sso	AR-OR Sso
<i>Methanoregula formicica</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosaeta concilii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosaeta harundinacea</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosalsum zhilinae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosarcina barkeri</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosarcina flavescens</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosarcina horonobensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosarcina mazei</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosarcina siciliae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosarcina soligelidi</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosarcina sp. 1.h.a.2.2</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosarcina sp. 1.h.t.1a.1</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosarcina sp. 2.h.a.1b.4</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosarcina sp. mtp4</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosarcina thermophila</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosphaera sp. wgk6</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanosphaerula palustris</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanospirillum hungatei</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Methanothermococcus okinawensis</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Methanothermus fervidus</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Methanotorris formicicus</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Methanotorris igneus</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Methermicoccus shengliensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Palaeococcus ferrophilus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Palaeococcus pacificus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pyrobaculum islandicum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pyrococcus abyssi</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pyrococcus furiosus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pyrococcus kukulkanii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pyrococcus sp. na2</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pyrococcus sp. st04</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pyrococcus yayanosii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pyrodictium delaneyi</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Pyrodictium occultum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pyrolobus fumarii</i>	+	+	-	+	+	-

Organismus	ACS Pfu	BC-OR Pfu	AR-OR Pfu	ACS Sso	BC-OR Sso	AR-OR Sso
<i>Staphylothermus hellenicus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylothermus marinus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Sulfolobus islandicus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Sulfolobus sp. a20</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus barophilus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus celericrescens</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus chitonophagus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus cleftensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus eurythermalis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus gammatolerans</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus guaymasensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus litoralis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus nautili</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus onnurineus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus paralvinellae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus peptonophilus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus piezophilus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus sibiricus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus sp. 2319x1</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus sp. 4557</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus sp. am4</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus sp. ep1</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus sp. pk</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus thioreducens</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermococcus zilligii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermofilum adornatus</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Thermofilum carboxyditrophus</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Thermofilum pendens</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermofilum uzonense</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermogladius cellulolyticus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermoplasma volcanium</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermoplasmatales archaeon brna1</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermoproteus tenax</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermoproteus uzoniensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thermosphaera aggregans</i>	+	+	+	+	+	+

Organismus	ACS Pfu	BC-OR Pfu	AR-OR Pfu	ACS Sso	BC-OR Sso	AR-OR Sso
<i>Vulcanisaeta distributa</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Vulcanisaeta moutnovskia</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Vulcanisaeta souniana</i>	+	-	+	+	-	+
<i>Vulcanisaeta sp. jcm 14467</i>	-	+	-	+	+	-
<i>Vulcanisaeta thermophila</i>	+	+	+	+	+	+

Anhang 8: Zugriff auf die Modellierungsplattform zu Testzwecken.

Eine Anleitung zu Testzwecken der in dieser Arbeit vorgestellten Modellierungsplattform findet sich im digitalen Anhang, welcher dieser Arbeit beigelegt ist, sowie unter der folgenden Adresse:

<https://drive.google.com/open?id=0B2BXNYv5ILscjFFTmxTNzhBQjQ>

Zu Abbildung 28: Die Abkürzungen für Enzyme und Metabolite im Zentralstoffwechsel von *S. solfataricus* P2.

(G1P) Glucose-1-phosphat, (G6P) Glucose-6-phosphat, (F6P) Fructose-6-phosphat, (PRPP) Phosphoribosylpyrophosphat, (Xyl5P) Xylulose-5-phosphat, (GAP) Glyceraldehyd-3-phosphat, (DHAP) Dihydroxyacetonphosphat, (KDPG) 2-Keto-3-deoxyphosphogluconat, (KDG) 2-Keto-3-deoxygluconat, (GA) Glucan-1,4- α -Glucosidase, (GLGA) Glucose-1-phosphat-Adenylyltransferase, (Glycogen-Synthase), (GLGP) Glycogen-Phosphorylase, (HK) Hexokinase, (GDH) Glucose-Dehydrogenase, (PGM) Phosphoglucomutase, (TK) Transketolase, (TPI) Triosephosphat-Isomerase, (PGI) Glucose-6-phosphat-Isomerase, (GAD) Gluconat-Dehydratase, (FBPase) Fructosebisphosphat-Aldolase, (PHI) Phosphohexulose-Isomerase, (HPS) Hexulosephosphat-Synthase, (RPI) Ribose-5-phosphat-Isomerase, (RBSK) Ribosekinase, (PRS) Ribosephosphatdiphosphokinase, (KD(GK)) 2-Keto-3-deoxy-Kinase, (KD(P)GA) 2-Keto-3-deoxygluconat-Aldolase, (GAD) Glyceraldehyd-Dehydrogenase, (GK) Glycerat-Kinase, (GAPDH) Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, (PGK) Phosphoglycerat-Kinase, (GAPN) Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, (PGAM) Phosphoglycerat-Mutase, (ENO) Phosphoenolpyruvat-Hydratase, (PK) Pyruvat-Kinase, (PEPS) Phosphoenolpyruvat-Synthase.

Literaturverzeichnis

- 1 Palsson, B. and Palsson, B. Ø. (2015) Systems Biology, *Cambridge University Press*.
- 2 Nielsen, J. (2017) Systems Biology of Metabolism. **Annu. Rev. Biochem.** **86**, 11.1-11.30.
- 3 Camacho, D. M. and Collins, J. J. (2009) Systems Biology Strikes Gold. **Cell** **137**, 24–26.
- 4 Dunn, W. B. and Ellis, D. I. (2005) Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends Anal. Chem.** **24**, 285–294.
- 5 Edwards, J. S. and Palsson, B. O. (1999) Systems Properties of the *Haemophilus influenzae* Rd Metabolic Genotype. **J. Biol. Chem.** **274**, 17410–17416.
- 6 Bartell, J. A., Blazier, A. S., Yen, P., Thøgersen, J. C., Jelsbak, L., Goldberg, J. B. and Papin, J. A. (2017) Reconstruction of the metabolic network of *Pseudomonas aeruginosa* to interrogate virulence factor synthesis. **Nat. Commun.** **8**.
- 7 Bosi, E., Monk, J. M., Aziz, R. K., Fondi, M., Nizet, V. and Palsson, B. Ø. (2016) Comparative genome-scale modelling of *Staphylococcus aureus* strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **113**, E3801–E3809.
- 8 Kell, D. B. (2006) Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development. **Drug Discov. Today** **11**, 1085–1092.
- 9 Nilsson, A. and Nielsen, J. (2017) Genome scale metabolic modeling of cancer. **Metab. Eng.**
- 10 Becker, J., Zelder, O., Häfner, S., Schröder, H. and Wittmann, C. (2011) From zero to hero—Design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for l-lysine production. **Metab. Eng.** **13**, 159–168.
- 11 Oberhardt, M. A., Palsson, B. Ø. and Papin, J. A. (2009) Applications of genome-scale metabolic reconstructions. **Mol. Syst. Biol.** **5**.
- 12 Patil, K. R., Åkesson, M. and Nielsen, J. (2004) Use of genome-scale microbial models for metabolic engineering. **Curr. Opin. Biotechnol.** **15**, 64–69.
- 13 Kitano, H. (2002) Systems Biology: A Brief Overview. **Science** **295**, 1662–1664.

- 14 Gombert, A. K. and Nielsen, J. (2000) Mathematical modelling of metabolism. **Curr. Opin. Biotechnol.** **11**, 180–186.
- 15 Thiele, I. and Palsson, B. Ø. (2010) A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. **Nat. Protoc.** **5**, 93–121.
- 16 Pirt, S. J. (1965) The Maintenance Energy of Bacteria in Growing Cultures. **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** **163**, 224–231.
- 17 Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. and Schaechter, M. (1990) Physiology of the bacterial cell : a molecular approach, *Sinauer, Sunderland*.
- 18 Webb, E. C. and NC-IUBMB. (1992) Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse, *Academic Press, New York, NY*.
- 19 (2017) Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. **Nucleic Acids Res.** **45**, D331–D338.
- 20 Quester, S. and Schomburg, D. (2011) EnzymeDetector: an integrated enzyme function prediction tool and database. **BMC Bioinformatics** **12**, 376.
- 21 Urbiet, M. S., Donati, E. R., Chan, K.-G., Shahar, S., Sin, L. L. and Goh, K. M. (2015) Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. **Biotechnol. Adv.** **33**, 633–647.
- 22 Madigan, M. T. and Orent, A. (1999) Thermophilic and halophilic extremophiles. **Curr. Opin. Microbiol.** **2**, 265–269.
- 23 Ladenstein, R. and Antranikian, G. (1998) Proteins from hyperthermophiles: Stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water. **In Biotechnology of Extremophiles** (Antranikian, G., ed.), pp 37–85, *Springer Berlin Heidelberg*.
- 24 Grogan, D. W. (1998) Hyperthermophiles and the problem of DNA instability. **Mol. Microbiol.** **28**, 1043–1049.
- 25 Vossenberg, J. L. C. M. van de, Driessen, A. J. M. and Konings, W. N. (1998) The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. **Extremophiles** **2**, 163–170.
- 26 Jain, S., Caforio, A. and Driessen, A. J. M. (2014) Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. **Microb. Physiol. Metab.** **5**, 641.
- 27 Koga, Y. (2012) Thermal Adaptation of the Archaeal and Bacterial Lipid Membranes. **Archaea** **2012**, 1–6.
- 28 Langworthy, T. A., Holzer, G., Zeikus, J. G. and Tornabene, T. G. (1983) Iso- and Anteiso-Branched Glycerol Diethers of the Thermophilic Anaerobe *Thermodesulfotobacterium commune*. **Syst. Appl. Microbiol.** **4**, 1–17.

- 29 Burggraf, S., Olsen, G. J., Stetter, K. O. and Woese, C. R. (1992) A Phylogenetic Analysis of *Aquifex pyrophilus*. **Syst. Appl. Microbiol.** **15**, 352–356.
- 30 Donato, M. M., Seleiro, E. A. and Da costa, M. S. (1990) Polar Lipid and Fatty Acid Composition of Strains of the Genus *Thermus*. **Syst. Appl. Microbiol.** **13**, 234–239.
- 31 Huber, R., Woese, C. R., Langworthy, T. A., Kristjansson, J. K. and Stetter, K. O. (1990) *Fervidobacterium islandicum* sp. nov., a new extremely thermophilic eubacterium belonging to the “Thermotogales.” **Arch. Microbiol.** **154**, 105–111.
- 32 Rosa, M. D., Gambacorta, A., Huber, R., Lanzotti, V., Nicolaus, B., O. Stetter, K. and Trincone, A. (1988) A new 15,16-dimethyl-30-glyceryloxytriacontanoic acid from lipids of *Thermotoga maritima*. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.** **0**, 1300–1301.
- 33 Hara, M., Yamano, Y., Sakai, Y., Kodama, E., Hoshino, T., Ito, M. and Miyake, J. (2008) Stabilization of liposomal membranes by carotenoids: Zeaxanthin, zeaxanthin glucoside and thermozeaxanthin. **Mater. Sci. Eng. C** **28**, 274–279.
- 34 Lutnaes, B. F., Strand, Å., Pétursdóttir, S. K. and Liaaen-Jensen, S. (2004) Carotenoids of thermophilic bacteria—*Rhodothermus marinus* from submarine Icelandic hot springs. **Biochem. Syst. Ecol.** **32**, 455–468.
- 35 Ray, P. H., White, D. C. and Brock, T. D. (1971) Effect of Growth Temperature on the Lipid Composition of *Thermus aquaticus*. **J. Bacteriol.** **108**, 227–235.
- 36 Beeby, M., O'Connor, B. D., Ryttersgaard, C., Boutz, D. R., Perry, L. J. and Yeates, T. O. (2005) The Genomics of Disulfide Bonding and Protein Stabilization in Thermophiles. **PLOS Biol.** **3**, e309.
- 37 Dalhus, B., Saarinen, M., Sauer, U. H., Eklund, P., Johansson, K., Karlsson, A., Ramaswamy, S., Bjørk, A., Synstad, B., Naterstad, K., et al. (2002) Structural Basis for Thermophilic Protein Stability: Structures of Thermophilic and Mesophilic Malate Dehydrogenases. **J. Mol. Biol.** **318**, 707–721.
- 38 Kumar, S., Singh, S. K. and Gromiha, M. M. (2010) Temperature-Dependent Molecular Adaptations, Microbial Proteins. In **Encyclopedia of Industrial Biotechnology**, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- 39 Fukuchi, S. and Nishikawa, K. (2001) Protein surface amino acid compositions distinctively differ between thermophilic and mesophilic bacteria¹. **J. Mol. Biol.** **309**, 835–843.
- 40 Faria, T. Q., Lima, J. C., Bastos, M., Maçanita, A. L. and Santos, H. (2004) Protein Stabilization by Osmolytes from Hyperthermophiles. **J. Biol. Chem.** **279**, 48680–48691.

- 41 Borges, N., Ramos, A., Raven, N. D., Sharp, R. J. and Santos, H. (2002) Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. **Extremophiles** **6**, 209–216.
- 42 Sabath, N., Ferrada, E., Barve, A. and Wagner, A. (2013) Growth Temperature and Genome Size in Bacteria Are Negatively Correlated, Suggesting Genomic Streamlining During Thermal Adaptation. **Genome Biol. Evol.** **5**, 966–977.
- 43 Oost, J. van der, Ciaramella, M., Moracci, M., Pisani, F. M., Rossi, M. and Vos, W. M. de. (1998) Molecular biology of hyperthermophilic Archaea. In **Biotechnology of Extremophiles** (Antranikian, G., ed.), pp 87–115, *Springer Berlin Heidelberg*.
- 44 Guipaud, O., Marguet, E., Noll, K. M., Tour, C. B. de la and Forterre, P. (1997) Both DNA gyrase and reverse gyrase are present in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **94**, 10606–10611.
- 45 Forterre, P., Bergerat, A. and Lopex-Garcia, P. (1996) The unique DNA topology and DNA topoisomerases of hyperthermophilic archaea. **FEMS Microbiol. Rev.** **18**, 237–248.
- 46 Oshima, T. (2007) Unique polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. **Amino Acids** **33**, 367–372.
- 47 Uzawa, T., Hamasaki, N. and Oshima, T. (1993) Effects of Novel Polyamines on Cell-Free Polypeptide Synthesis Catalyzed by *Thermus thermophilus* HB8 Extract. **J. Biochem. (Tokyo)** **114**, 478–486.
- 48 Bachrach, U. and Heimer, Y. M. (1989) *The Physiology of Polyamines*, *CRC Press*.
- 49 Oshima, T., Hamasaki, N. and Uzawa, T. (1988) Biochemical Properties of Unusual Polyamines Found in an Extreme Thermophile, *Thermus thermophilus*. In **Progress in Polyamine Research** (Zappia, V., and Pegg, A. E., eds.), pp 633–642, *Springer US*.
- 50 L. Bergquist, P., W. Morgan, H. and Saul, D. (2014) Selected Enzymes from Extreme Thermophiles with Applications in Biotechnology. **Curr. Biotechnol.** **3**, 45–59.
- 51 Elleuche, S., Schröder, C., Sahm, K. and Antranikian, G. (2014) Extremozymes — biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. **Curr. Opin. Biotechnol.** **29**, 116–123.
- 52 Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W. W., Short, J. M., Sorge, J. A. and Mathur, E. J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. **Gene** **108**, 1–6.

-
- 53 Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K., Drummond, R. and Gelfand, D. H. (1989) Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. **J. Biol. Chem.** **264**, 6427–6437.
- 54 Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.** **51**, 263–273.
- 55 Ilyas, S., Lee, J. and Kim, B. (2014) Bioremoval of heavy metals from recycling industry electronic waste by a consortium of moderate thermophiles: process development and optimization. **J. Clean. Prod.** **70**, 194–202.
- 56 Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, K. M. and Sani, R. K. (2013) Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. **Bioresour. Technol.** **128**, 751–759.
- 57 Bhandiwad, A., Guseva, A. and Lynd, L. (2013) Metabolic Engineering of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* for Increased n-Butanol Production. **Adv. Microbiol.** **03**, 46–51.
- 58 Griffiths, E. and Gupta, R. S. (2004) Distinctive Protein Signatures Provide Molecular Markers and Evidence for the Monophyletic Nature of the *Deinococcus-Thermus* Phylum. **J. Bacteriol.** **186**, 3097–3107.
- 59 Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.-H., Ludwig, W., Glöckner, F. O. and Rosselló-Móra, R. (2008) The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. **Syst. Appl. Microbiol.** **31**, 241–250.
- 60 OSHIMA, T. and IMAHORI, K. (1974) Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **24**, 102–112.
- 61 Williams, R. A., Smith, K. E., Welch, S. G., Micallef, J. and Sharp, R. J. (1995) DNA relatedness of *Thermus* strains, description of *Thermus brockianus* sp. nov., and proposal to reestablish *Thermus thermophilus* (Oshima and Imahori). **Int. J. Syst. Bacteriol.** **45**, 495–499.
- 62 Cava, F., Hidalgo, A. and Berenguer, J. (2009) *Thermus thermophilus* as biological model. **Extremophiles** **13**, 213–231.
- 63 Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P.-F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J. L. and Aragno, M. (1996) Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 degrees C). **Appl. Environ. Microbiol.** **62**, 1723–1727.

-
- 64 Friedrich, A., Prust, C., Hartsch, T., Henne, A. and Averhoff, B. (2002) Molecular Analyses of the Natural Transformation Machinery and Identification of Pilus Structures in the Extremely Thermophilic Bacterium *Thermus thermophilus* Strain HB27. **Appl. Environ. Microbiol.** **68**, 745–755.
- 65 Friedrich, A., Rumszauer, J., Henne, A. and Averhoff, B. (2003) Pilin-Like Proteins in the Extremely Thermophilic Bacterium *Thermus thermophilus* HB27: Implication in Competence for Natural Transformation and Links to Type IV Pilus Biogenesis. **Appl. Environ. Microbiol.** **69**, 3695–3700.
- 66 Yokoyama, A., Sandmann, G., Hoshino, T., Adachi, K., Sakai, M. and Shizuri, Y. (1995) Thermozeaxanthins, new carotenoid-glycoside-esters from thermophilic eubacterium *thermus thermophilus*. **Tetrahedron Lett.** **36**, 4901–4904.
- 67 Yokoyama, A., Shizuri, Y., Hoshino, T. and Sandmann, G. (1996) Thermocryptoxanthins: novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *Thermus thermophilus*. **Arch. Microbiol.** **165**, 342–345.
- 68 Henne, A., Brüggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martinez-Arias, R., et al. (2004) The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. **Nat. Biotechnol.** **22**, 547–553.
- 69 Koyama, Y., Hoshino, T., Tomizuka, N. and Furukawa, K. (1986) Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. **J. Bacteriol.** **166**, 338–340.
- 70 Koyama, Y., Arikawa, Y. and Furukawa, K. (1990) A plasmid vector for an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. **FEMS Microbiol. Lett.** **72**, 97–101.
- 71 de Grado, M., Lasa, I. and Berenguer, J. (1998) Characterization of a plasmid replicative origin from an extreme thermophile. **FEMS Microbiol. Lett.** **165**, 51–57.
- 72 de Grado, M., Castán, P. and Berenguer, J. (1999) A High-Transformation-Efficiency Cloning Vector for *Thermus thermophilus*. **Plasmid** **42**, 241–245.
- 73 Stark, H. (2013) Erstellung und In-silico-Analyse eines genomweiten metabolischen Modells für *Thermus thermophilus*. **Tech. Univ. Braunsch.** [Masterarbeit].
- 74 Lee, N.-R., Lakshmanan, M., Aggarwal, S., Song, J.-W., Karimi, I. A., Lee, D.-Y. and Park, J.-B. (2014) Genome-scale metabolic network reconstruction and in silico flux analysis of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. **Microb. Cell Factories** **13**, 61.

- 75 Pantazaki, A., Pritsa, A. and Kyriakidis, D. (2002) Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **58**, 1–12.
- 76 Desai, J. D. and Banat, I. M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** **61**, 47–64.
- 77 El-Sheshtawy, H. S. and Doheim, M. M. Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. **Egypt. J. Pet.**
- 78 Pantazaki, A. A., Dimopoulou, M. I., Simou, O. M. and Pritsa, A. A. (2010) Sunflower seed oil and oleic acid utilization for the production of rhamnolipids by *Thermus thermophilus* HB8. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **88**, 939–951.
- 79 Pantazaki, A. A., Papaneophytou, C. P. and Lambropoulou, D. A. (2011) Simultaneous polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids production by *Thermus thermophilus* HB8. **AMB Express** **1**, 1–13.
- 80 Alarico, S., Empadinhas, N., Simões, C., Silva, Z., Henne, A., Mingote, A., Santos, H. and Costa, M. S. da. (2005) Distribution of Genes for Synthesis of Trehalose and Mannosylglycerate in *Thermus* spp. and Direct Correlation of These Genes with Halotolerance. **Appl. Environ. Microbiol.** **71**, 2460–2466.
- 81 Alarico, S., Empadinhas, N., Mingote, A., Simões, C., Santos, M. S. and Costa, M. S. (2007) Mannosylglycerate is essential for osmotic adjustment in *Thermus thermophilus* strains HB27 and RQ-1. **Extremophiles** **11**, 833–840.
- 82 Lentzen, G. and Schwarz, T. (2006) Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **72**, 623–634.
- 83 Zillig, W., Stetter, K. O., Wunderl, S., Schulz, W., Priess, H. and Scholz, I. (1980) The *Sulfolobus*-“*Caldariella*” group: Taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. **Arch. Microbiol.** **125**, 259–269.
- 84 Nicolaus, B., Trincone, A., Lama, L., Romano, I., Marsiglia, F. and Gambacorta, A. (1991) Adaptation of *Sulfolobus solfataricus* on minimal media. **Biotechnol. Lett.** **13**, 667–670.
- 85 Izzo, V., Notomista, E., Picardi, A., Pennacchio, F. and Di Donato, A. (2005) The thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is able to grow on phenol. **Res. Microbiol.** **156**, 677–689.
- 86 Rosa, M. D., Gambacorta, A. and Bu’lock, J. D. (1975) Extremely Thermophilic Acidophilic Bacteria Convergent with *Sulfolobus Acidocaldarius*. **J. Gen. Microbiol.** **86**, 156–164.

- 87 Zaparty, M. and Siebers, B. (2011) Physiology, Metabolism, and Enzymology of Thermoacidophiles. In **Extremophiles Handbook** (Horikoshi, K., ed.), pp 601–639, *Springer Japan*.
- 88 Berg, I. A., Kockelkorn, D., Buckel, W. and Fuchs, G. (2007) A 3-Hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate Autotrophic Carbon Dioxide Assimilation Pathway in Archaea. **Science** **318**, 1782–1786.
- 89 Huber, G., Drobner, E., Huber, H. and Stetter, K. O. (1992) Growth by Aerobic Oxidation of Molecular Hydrogen in Archaea —a Metabolic Property so far Unknown for this Domain. **Syst. Appl. Microbiol.** **15**, 502–504.
- 90 Chong, P. K., Burja, A. M., Radianingtyas, H., Fazeli, A. and Wright, P. C. (2007) Proteome Analysis of *Sulfolobus solfataricus* P2 Propanol Metabolism. **J. Proteome Res.** **6**, 1430–1439.
- 91 Payne, K. A. P., Hough, D. W. and Danson, M. J. (2010) Discovery of a putative acetoin dehydrogenase complex in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. **FEBS Lett.** **584**, 1231–1234.
- 92 Ulas, T., Riemer, S. A., Zaparty, M., Siebers, B. and Schomburg, D. (2012) Genome-Scale Reconstruction and Analysis of the Metabolic Network in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus Solfataricus*. **PLoS ONE** (Parkinson, J., ed.) **7**, e43401.
- 93 She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Christina, C.-Y., Clausen, I. G., Curtis, B. A. and De Moors, A. (2001) The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **98**, 7835–7840.
- 94 Worthington, P., Hoang, V., Perez-Pomares, F. and Blum, P. (2003) Targeted Disruption of the α -Amylase Gene in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. **J. Bacteriol.** **185**, 482–488.
- 95 Albers, S.-V. and Driessen, A. J. M. (2008) Conditions for gene disruption by homologous recombination of exogenous DNA into the *Sulfolobus solfataricus* genome. **Archaea** **2**, 145–149.
- 96 Thompson, R. A., Dahal, S., Garcia, S., Nookaew, I. and Trinh, C. T. (2016) Exploring complex cellular phenotypes and model-guided strain design with a novel genome-scale metabolic model of *Clostridium thermocellum* DSM 1313 implementing an adjustable cellulosome. **Biotechnol. Biofuels** **9**, 194.
- 97 Gowen, C. M. and Fong, S. S. (2010) Genome-scale metabolic model integrated with RNAseq data to identify metabolic states of *Clostridium thermocellum*. **Biotechnol. J.** **5**, 759–767.
- 98 Roberts, S. B., Gowen, C. M., Brooks, J. P. and Fong, S. S. (2010) Genome-scale metabolic analysis of *Clostridium thermocellum* for bioethanol production. **BMC Syst. Biol.** **4**, 31.

-
- 99 Ahsanul Islam, M., Zengler, K., A. Edwards, E., Mahadevan, R. and Stephanopoulos, G. (2015) Investigating *Moorella thermoacetica* metabolism with a genome-scale constraint-based metabolic model. **Integr. Biol.** **7**, 869–882.
- 100 Swarup, A., Lu, J., DeWoody, K. C. and Antoniewicz, M. R. (2014) Metabolic network reconstruction, growth characterization and ¹³C-metabolic flux analysis of the extremophile *Thermus thermophilus* HB8. **Metab. Eng.** **24**, 173–180.
- 101 Tong, W., Chen, Z., Cao, Z., Wang, Q., Zhang, J., Bai, X., Wang, R. and Liu, S. (2013) Robustness analysis of a constraint-based metabolic model links cell growth and proteomics of *Thermoanaerobacter tengcongensis* under temperature perturbation. **Mol. Biosyst.** **9**, 713.
- 102 Zhang, Y., Thiele, I., Weekes, D., Li, Z., Jaroszewski, L., Ginalski, K., Deacon, A. M., Wooley, J., Lesley, S. A., Wilson, I. A., et al. (2009) Three-Dimensional Structural View of the Central Metabolic Network of *Thermotoga maritima*. **Science** **325**, 1544–1549.
- 103 Klamt, S., Haus, U.-U. and Theis, F. (2009) Hypergraphs and Cellular Networks. **PLOS Comput. Biol.** **5**, e1000385.
- 104 Price, N. D., Reed, J. L. and Palsson, B. Ø. (2004) Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. **Nat. Rev. Microbiol.** **2**, 886–897.
- 105 Lee, J. M. (2006) Flux balance analysis in the era of metabolomics. **Brief. Bioinform.** **7**, 140–150.
- 106 Hucka, M., Finney, A., Sauro, H. M., Bolouri, H., Doyle, J. C., Kitano, H., Arkin, A. P., Bornstein, B. J., Bray, D., Cornish-Bowden, A., et al. (2003) The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. **Bioinformatics** **19**, 524–531.
- 107 Lang, M., Stelzer, M. and Schomburg, D. (2011) BKM-react, an integrated biochemical reaction database. **BMC Biochem.** **12**, 42.
- 108 Chang, A., Schomburg, I., Placzek, S., Jeske, L., Ulbrich, M., Xiao, M., Sensen, C. W. and Schomburg, D. (2014) BRENDA in 2015: exciting developments in its 25th year of existence. **Nucleic Acids Res.** gku1068.
- 109 Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foerster, H., Fulcher, C. A., Holland, T. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Kubo, A., et al. (2013) The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. **Nucleic Acids Res.** **42**, D459–D471.
- 110 Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M. and Tanabe, M. (2013) Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. **Nucleic Acids Res.** **42**, D199–D205.

- 111 Ren, Q., Chen, K. and Paulsen, I. T. (2007) TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels. **Nucleic Acids Res.** **35**, D274–D279.
- 112 (2015) UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Res.** **43**, D204–D212.
- 113 Wattam, A. R., Abraham, D., Dalay, O., Disz, T. L., Driscoll, T., Gabbard, J. L., Gillespie, J. J., Gough, R., Hix, D., Kenyon, R., et al. (2014) PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. **Nucleic Acids Res.** **42**, D581–D591.
- 114 O’Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufo, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., et al. (2016) Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic Acids Res.** **44**, D733–D745.
- 115 Sayers, E. W., Barrett, T., Benson, D. A., Bolton, E., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D. M., DiCuccio, M., Federhen, S., et al. (2012) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Res.** **40**, D13–D25.
- 116 Bannert, C., Welfle, A., aus dem Spring, C. and Schomburg, D. (2010) BrEPS: a flexible and automatic protocol to compute enzyme-specific sequence profiles for functional annotation. **BMC Bioinformatics** **11**, 589.
- 117 Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., et al. (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Res.** **44**, D279–D285.
- 118 Ulas, T. (2012) Genombasierte Rekonstruktion und Analyse der metabolischen Netze von *Sulfolobus solfataricus* und *Corynebacterium glutamicum*. **Tech. Univ. Braunsch.** [Dissertation].
- 119 Orth, J. D., Conrad, T. M., Na, J., Lerman, J. A., Nam, H., Feist, A. M. and Palsson, B. Ø. (2011) A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism—2011. **Mol. Syst. Biol.** **7**.
- 120 Rex, R. (2012) Towards a new view on metabolic networks: Automated reconstruction and large-scale computational analysis applied to *Dinoroseobacter shibae*. **Tech. Univ. Braunsch.** [Dissertation].
- 121 Rex, R., Bill, N., Schmidt-Hohagen, K. and Schomburg, D. (2013) Swimming in Light: A Large-Scale Computational Analysis of the Metabolism of *Dinoroseobacter shibae*. **PLoS Comput. Biol.** (Maranas, C. D., ed.) **9**, e1003224.

- 122 Mahadevan, R. and Schilling, C. H. (2003) The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. **Metab. Eng.** **5**, 264–276.
- 123 Reed, J. L. and Palsson, B. Ø. (2004) Genome-Scale In Silico Models of E. coli Have Multiple Equivalent Phenotypic States: Assessment of Correlated Reaction Subsets That Comprise Network States. **Genome Res.** **14**, 1797–1805.
- 124 Segre, D., Vitkup, D. and Church, G. M. (2002) Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **99**, 15112–15117.
- 125 Berg, J. M., Tymoczko, J. L., John, L. and Stryer, L. (2002) Biochemistry, *W.H. Freeman, New York*.
- 126 Riemer, S. A., Rex, R. and Schomburg, D. (2013) A metabolite-centric view on flux distributions in genome-scale metabolic models. **BMC Syst. Biol.** **7**, 33.
- 127 Narang, P., Khan, S., Hemrom, A. J., Open Source Drug Discovery Consortium and Lynn, A. M. (2014) MetaNET - a web-accessible interactive platform for biological metabolic network analysis. **BMC Syst. Biol.** **8**, 130.
- 128 Dandekar, T., Fieselmann, A., Majeed, S. and Ahmed, Z. (2014) Software applications toward quantitative metabolic flux analysis and modeling. **Brief. Bioinform.** **15**, 91–107.
- 129 Lakshmanan, M., Koh, G., Chung, B. K. S. and Lee, D.-Y. (2014) Software applications for flux balance analysis. **Brief. Bioinform.** **15**, 108–122.
- 130 Becker, S. A., Feist, A. M., Mo, M. L., Hannum, G., Palsson, B. Ø. and Herrgard, M. J. (2007) Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox. **Nat. Protoc.** **2**, 727–738.
- 131 Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R. M. T., Thiele, I., Orth, J. D., Feist, A. M., Zielinski, D. C., Bordbar, A., Lewis, N. E., Rahmanian, S., et al. (2011) Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. **Nat. Protoc.** **6**, 1290–1307.
- 132 Pedersen, A., Karlsson, G. B. and Rydström, J. (2008) Proton-translocating transhydrogenase: an update of unsolved and controversial issues. **J. Bioenerg. Biomembr.** **40**, 463–473.
- 133 Sazanov, L. A. and Jackson, J. B. (1994) Proton-translocating transhydrogenase and NAD- and NADP-linked isocitrate dehydrogenases operate in a substrate cycle which contributes to fine regulation of the tricarboxylic acid cycle activity in mitochondria. **FEBS Lett.** **344**, 109–116.

-
- 134 Pantazaki, A. A., Tambaka, M. G., Langlois, V., Guerin, P. and Kyriakidis, D. A. (2003) Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in *Thermus thermophilus*: purification and biochemical properties of PHA synthase. **Mol. Cell. Biochem.** **254**, 173–183.
- 135 Mandelli, F., Yamashita, F., Pereira, J. L. and Mercadante, A. Z. (2012) Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design. **Braz. J. Microbiol.** **43**, 126–134.
- 136 Quintela, J. C., Pittenauer, E., Allmaier, G., Aran, V. and De Pedro, M. A. (1995) Structure of peptidoglycan from *Thermus thermophilus* HB8. **J. Bacteriol.** **177**, 4947–4962.
- 137 Schaffer, C. (2005) The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together. **Microbiology** **151**, 643–651.
- 138 Cava, F., De Pedro, M. A., Schwarz, H., Henne, A. and Berenguer, J. (2004) Binding to pyruvylated compounds as an ancestral mechanism to anchor the outer envelope in primitive bacteria: Attachment of the S-layer to the cell wall of *T. thermophilus*. **Mol. Microbiol.** **52**, 677–690.
- 139 Bennett, B. D., Kimball, E. H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S. J. and Rabinowitz, J. D. (2009) Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. **Nat. Chem. Biol.** **5**, 593–599.
- 140 Boeck, B. and Schinzel, R. (1998) Growth dependence of α -glucan phosphorylase activity in *Thermus thermophilus*. **Res. Microbiol.** **149**, 171–176.
- 141 Bratbak, G. and Dundas, I. (1984) Bacterial dry matter content and biomass estimations. **Appl. Environ. Microbiol.** **48**, 755–757.
- 142 De Rosa, M., Esposito, E., Gambacorta, A., Nicolaus, B. and Bu'Lock, J. D. (1980) Effects of temperature on ether lipid composition of *Caldariella acidophila*. **Phytochemistry** **19**, 827–831.
- 143 Pask-Hughes, R. A. and Shaw, N. (1982) Glycolipids from some extreme thermophilic bacteria belonging to the genus *Thermus*. **J. Bacteriol.** **149**, 54–58.
- 144 Ferraz, A. S., Carreto, L., Tenreiro, S., Nobre, M. F. and Costa, M. S. da. (1994) Polar lipids and fatty acid composition of *Thermus* strains from New Zealand. **Antonie Van Leeuwenhoek** **66**, 357–363.
- 145 McKay, A., Quilter, J. and Jones, C. W. (1982) Energy conservation in the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8. **Arch. Microbiol.** **131**, 43–50.

-
- 146 Leone, S. (2006) The structures of glycolipids isolated from the highly thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* Samu-SA1. **Glycobiology** **16**, 766–775.
- 147 Demirtas, M. U., Kolhatkar, A. and Kilbane II, J. J. (2003) Effect of aeration and agitation on growth rate of *Thermus thermophilus* in batch mode. **J. Biosci. Bioeng.** **95**, 113–117.
- 148 Hinkle, P. C. (2005) P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. **Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.** **1706**, 1–11.
- 149 Lee, C. P., Gu, Q., Xiong, Y., Mitchell, R. A. and Ernster, L. (1996) P/O ratios reassessed: mitochondrial P/O ratios consistently exceed 1.5 with succinate and 2.5 with NAD-linked substrates. **FASEB J.** **10**, 345–350.
- 150 Eguchi, H., Wakagi, T. and Oshima, T. (1989) A highly stable NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8: purification and general properties. **Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.** **990**, 133–137.
- 151 Sonnleitner, B., Cometta, S. and Fiechter, A. (1982) Growth kinetics of *Thermus thermophilus*. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** **15**, 75–82.
- 152 Entner, N. and Doudoroff, M. (1952) Glucose and Gluconic Acid Oxidation of *Pseudomonas Saccharophila*. **J. Biol. Chem.** **196**, 853–862.
- 153 MacGee, J. and Doudoroff, M. (1954) A New Phosphorylated Intermediate in Glucose Oxidation. **J. Biol. Chem.** **210**, 617–626.
- 154 Kovachevich, R. and Wood, W. A. (1955) Carbohydrate Metabolism by *Pseudomonas Fluorescens* lii. Purification and Properties of a 6-Phosphogluconate Dehydrase. **J. Biol. Chem.** **213**, 745–756.
- 155 Conway, T. (1992) The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. **FEMS Microbiol. Lett.** **103**, 1–27.
- 156 Ohshima, N., Inagaki, E., Yasuike, K., Takio, K. and Tahirov, T. H. (2004) Structure of *Thermus thermophilus* 2-Keto-3-deoxygluconate Kinase: Evidence for Recognition of an Open Chain Substrate. **J. Mol. Biol.** **340**, 477–489.
- 157 Brown, A. D. (1976) Microbial water stress. **Bacteriol. Rev.** **40**, 803–846.
- 158 Meikle, A. J., Reed, R. H. and Gadd, G. M. (1988) Osmotic Adjustment and the Accumulation of Organic Solutes in Whole Cells and Protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology** **134**, 3049–3060.
- 159 Welsh, D. T. (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. **FEMS Microbiol. Rev.** **24**, 263–290.

- 160 Nowacka, A., Douezan, S., Wadsö, L., Topgaard, D. and Sparr, E. (2012) Small polar molecules like glycerol and urea can preserve the fluidity of lipid bilayers under dry conditions. **Soft Matter** **8**, 1482–1491.
- 161 Lin, P.-S., Kwock, L. and Hefter, K. (1981) Protection of heat induced cytotoxicity by glycerol. **J. Cell. Physiol.** **108**, 439–443.
- 162 Beijer, L., Nilsson, R. P., Holmberg, C. and Rutberg, L. (1993) The glpP and glpF genes of the glycerol regulon in *Bacillus subtilis*. **J. Gen. Microbiol.** **139**, 349–359.
- 163 Schryvers, A., Lohmeier, E. and Weiner, J. H. (1978) Chemical and functional properties of the native and reconstituted forms of the membrane-bound, aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** **253**, 783–788.
- 164 Frohlich, K. M., Roberts, R. A. W., Housley, N. A. and Audia, J. P. (2010) *Rickettsia prowazekii* Uses an sn-Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase and a Novel Dihydroxyacetone Phosphate Transport System To Supply Triose Phosphate for Phospholipid Biosynthesis. **J. Bacteriol.** **192**, 4281–4288.
- 165 Edgar, J. R. and Bell, R. M. (1978) Biosynthesis in *Escherichia coli* of sn-glycerol 3-phosphate, a precursor of phospholipid. Kinetic characterization of wild type and feedback-resistant forms of the biosynthetic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase. **J. Biol. Chem.** **253**, 6354–6363.
- 166 Kito, M. and Pizer, L. I. (1969) Purification and Regulatory Properties of the Biosynthetic L-Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** **244**, 3316–3323.
- 167 Tromans, D. (2000) Modeling Oxygen Solubility in Water and Electrolyte Solutions. **Ind. Eng. Chem. Res.** **39**, 805–812.
- 168 Weiss, R. F. (1970) The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. **Deep Sea Res. Oceanogr. Abstr.** **17**, 721–735.
- 169 ABE-YOSHIZUMI, R., KAMEI, U., YAMADA, A., KIMURA, M. and ICHIHARA, S. (2004) The Evolution of the Phenylacetic Acid Degradation Pathway in Bacteria. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** **68**, 746–748.
- 170 Erb, T. J., Ismail, W. and Fuchs, G. (2008) Phenylacetate Metabolism in Thermophiles: Characterization of Phenylacetate-CoA Ligase, the Initial Enzyme of the Hybrid Pathway in *Thermus thermophilus*. **Curr. Microbiol.** **57**, 27–32.
- 171 Teufel, R., Mascaraque, V., Ismail, W., Voss, M., Perera, J., Eisenreich, W., Haehnel, W. and Fuchs, G. (2010) Bacterial phenylalanine and phenylacetate catabolic pathway revealed. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **107**, 14390–14395.

- 172 Sakamoto, K., Agari, Y., Kuramitsu, S. and Shinkai, A. (2011) Phenylacetyl Coenzyme A Is an Effector Molecule of the TetR Family Transcriptional Repressor PaaR from *Thermus thermophilus* HB8. **J. Bacteriol.** **193**, 4388–4395.
- 173 Quintela, J. C., Zöllner, P., García-del Portillo, F., Allmaier, G. and de Pedro, M. A. (1999) Cell wall structural divergence among *Thermus* spp. **FEMS Microbiol. Lett.** **172**, 223–229.
- 174 Griebel, R., Smith, Z. and Merrick, J. M. (1968) Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. **Biochemistry (Mosc.)** **7**, 3676–3681.
- 175 Anderson, A. J. and Dawes, E. A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Rev.** **54**, 450–472.
- 176 Lee, S. Y. (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnol. Bioeng.** **49**, 1–14.
- 177 Rehm, B. H. A. and Steinbüchel, A. (1999) Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **Int. J. Biol. Macromol.** **25**, 3–19.
- 178 Papaneophytou, C. P., Pantazaki, A. A. and Kyriakidis, D. A. (2009) An extracellular polyhydroxybutyrate depolymerase in *Thermus thermophilus* HB8. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **83**, 659–668.
- 179 Korotkova, N. and Lidstrom, M. E. (2001) Connection between Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthesis and Growth on C1 and C2 Compounds in the Methylophile *Methylobacterium extorquens* AM1. **J. Bacteriol.** **183**, 1038–1046.
- 180 Yokoyama, K., Oshima, T. and Yoshida, M. (1990) *Thermus thermophilus* membrane-associated ATPase. Indication of a eubacterial V-type ATPase. **J. Biol. Chem.** **265**, 21946–21950.
- 181 Wolf, J., Stark, H., Fafenrot, K., Albersmeier, A., Pham, T. K., Müller, K. B., Meyer, B., Hoffmann, L., Shen, L., Albaum, S. P., et al. (2016) A systems biology approach reveals major metabolic changes in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* in response to the carbon source L-fucose versus D-glucose. **Mol. Microbiol.** **102**, 882–908.
- 182 Stark, H., Wolf, J., Albersmeier, A., Pham, T. K., Hoffmann, J. D., Siebers, B., Kalinowski, J., Wright, P. C., Neumann-Schaal, M. and Schomburg, D. (2017) Oxidative Stickland reactions in an obligate aerobic organism — amino acid catabolism in the Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. **FEBS J.** **284**, 2078–2095.

- 183 Haseltine, C., Montalvo-Rodriguez, R., Carl, A., Bini, E. and Blum, P. (1999) Extragenic Pleiotropic Mutations That Repress Glycosyl Hydrolase Expression in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. **Genetics** **152**, 1353–1361.
- 184 Gamble, G. R. (2002) Thermochemical Degradation of Melezitose and Trehalulose as Related to Cotton Stickiness. **Text. Res. J.** **72**, 174–177.
- 185 Morana, A., Paris, O., Maurelli, L., Rossi, M. and Cannio, R. (2007) Gene cloning and expression in *Escherichia coli* of a bi-functional β -d-xylosidase/ α -l-arabinosidase from *Sulfolobus solfataricus* involved in xylan degradation. **Extremophiles** **11**, 123–132.
- 186 Hemmi, H., Ikejiri, S., Nakayama, T. and Nishino, T. (2003) Fusion-type lycopene β -cyclase from a thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **305**, 586–591.
- 187 Koga, Y. and Morii, H. (2005) Recent Advances in Structural Research on Ether Lipids from Archaea Including Comparative and Physiological Aspects. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** **69**, 2019–2034.
- 188 De Rosa, M., Gambacorta, A., Nicolaus, B. and Bu'Lock, J. D. (1980) Complex lipids of *Caldariella acidophila*, a thermoacidophile archaeobacterium. **Phytochemistry** **19**, 821–825.
- 189 Gambacorta, A., Caracciolo, G., Trabasso, D., Izzo, I., Spinella, A. and Sodano, G. (2002) Biosynthesis of calditol, the cyclopentanoid containing moiety of the membrane lipids of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. **Tetrahedron Lett.** **43**, 451–453.
- 190 Rosa, M. D., Rosa, S. D., Gambacorta, A., Minale, L., Thomson, R. H. and Worthington, R. D. (1977) *Caldariella*quinone, a unique benzo[b]thiophen-4,7-quinone from *Caldariella acidophila*, an extremely thermophilic and acidophilic bacterium. **J. Chem. Soc. [Perkin 1]** 653–657.
- 191 Zhou, D. and White, R. H. (1989) Biosynthesis of *caldariella*quinone in *Sulfolobus* spp. **J. Bacteriol.** **171**, 6610–6616.
- 192 Tumbula, D. L., Becker, H. D., Chang, W. and Söll, D. (2000) Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. **Nature** **407**, 106–110.
- 193 Lombo, T., Takaya, N., Miyazaki, J., Gotoh, K., Nishiyama, M., Kosuge, T., Nakamura, A. and Hoshino, T. (2004) Functional analysis of the small subunit of the putative homoaconitase from *Pyrococcus horikoshii* in the *Thermus* lysine biosynthetic pathway. **FEMS Microbiol. Lett.** **233**, 315–324.
- 194 Feist, A. M., Scholten, J. C. M., Palsson, B. Ø., Brockman, F. J. and Ideker, T. (2006) Modeling methanogenesis with a genome-scale metabolic reconstruction of *Methanosarcina barkeri*. **Mol. Syst. Biol.** **2**.

- 195 König, H., Skorko, R., Zillig, W. and Reiter, W.-D. (1982) Glycogen in thermoacidophilic archaebacteria of the genera *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Desulfurococcus* and *Thermococcus*. **Arch. Microbiol.** **132**, 297–303.
- 196 Preiss, J. (1984) Bacterial Glycogen Synthesis and its Regulation. **Annu. Rev. Microbiol.** **38**, 419–458.
- 197 Martins, L. O., Huber, R., Huber, H., Stetter, K. O., Costa, M. S. D. and Santos, H. (1997) Organic solutes in hyperthermophilic archaea. **Appl. Environ. Microbiol.** **63**, 896–902.
- 198 Nielsen, J. and Villadsen, J. (1994) Elemental Composition of Biomass 1. Edition., *Plenum Press, New York*.
- 199 Zillig, W. (1991) Comparative biochemistry of Archaea and Bacteria. **Curr. Opin. Genet. Dev.** **1**, 544–551.
- 200 Kerscher, L., Nowitzki, S. and Oesterhelt, D. (1982) Thermoacidophilic Archaebacteria Contain Bacterial-Type Ferredoxins Acting as Electron Acceptors of 2-Oxoacid: Ferredoxin Oxidoreductases. **Eur. J. Biochem.** **128**, 223–230.
- 201 Rosa, M. D., Gambacorta, A., Nicolaus, B., Giardina, P., Poerio, E. and Buonocore, V. (1984) Glucose metabolism in the extreme thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus solfataricus*. **Biochem. J.** **224**, 407–414.
- 202 Selig, M., Xavier, K. B., Santos, H. and Schönheit, P. (1997) Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*. **Arch. Microbiol.** **167**, 217–232.
- 203 Ma, K., Hutchins, A., Sung, S. J. and Adams, M. W. (1997) Pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*, functions as a CoA-dependent pyruvate decarboxylase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** **94**, 9608–9613.
- 204 Lamble, H. J., Heyer, N. I., Bull, S. D., Hough, D. W. and Danson, M. J. (2003) Metabolic Pathway Promiscuity in the Archaeon *Sulfolobus solfataricus* Revealed by Studies on Glucose Dehydrogenase and 2-Keto-3-deoxygluconate Aldolase. **J. Biol. Chem.** **278**, 34066–34072.
- 205 Lamble, H. J., Theodossis, A., Milburn, C. C., Taylor, G. L., Bull, S. D., Hough, D. W. and Danson, M. J. (2005) Promiscuity in the part-phosphorylative Entner–Doudoroff pathway of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. **FEBS Lett.** **579**, 6865–6869.
- 206 Lamble, H. J., Milburn, C. C., Taylor, G. L., Hough, D. W. and Danson, M. J. (2004) Gluconate dehydratase from the promiscuous Entner–Doudoroff pathway in *Sulfolobus solfataricus*. **FEBS Lett.** **576**, 133–136.

- 207 Ahmed, H., Ettema, T. J. G., Tjaden, B., Geerling, A. C. M., van der Oost, J. and Siebers, B. (2005) The semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea: a re-evaluation. **Biochem. J.** **390**, 529–540.
- 208 Bräsen, C., Esser, D., Rauch, B. and Siebers, B. (2014) Carbohydrate Metabolism in Archaea: Current Insights into Unusual Enzymes and Pathways and Their Regulation. **Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR** **78**, 89–175.
- 209 Albers, S.-V., Elferink, M. G. L., Charlebois, R. L., Sensen, C. W., Driessen, A. J. M. and Konings, W. N. (1999) Glucose Transport in the Extremely Thermoacidophilic *Sulfolobus solfataricus* Involves a High-Affinity Membrane-Integrated Binding Protein. **J. Bacteriol.** **181**, 4285–4291.
- 210 Elferink, M. G. L., Albers, S.-V., Konings, W. N. and Driessen, A. J. M. (2001) Sugar transport in *Sulfolobus solfataricus* is mediated by two families of binding protein-dependent ABC transporters. **Mol. Microbiol.** **39**, 1494–1503.
- 211 Petzelbauer, I., Nidetzky, B., Haltrich, D. and Kulbe, K. D. (1999) Development of an ultra-high-temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose. I. The properties of two thermostable β -glycosidases. **Biotechnol. Bioeng.** **64**, 322–332.
- 212 Kaper, T., Brouns, S. J. J., Geerling, A. C. M., De Vos, W. M. and Van der Oost, J. (2002) DNA family shuffling of hyperthermostable beta-glycosidases. **Biochem. J.** **368**, 461–470.
- 213 Kouril, T., Wieloch, P., Reimann, J., Wagner, M., Zaparty, M., Albers, S.-V., Schomburg, D., Ruoff, P. and Siebers, B. (2013) Unraveling the function of the two Entner–Doudoroff branches in the thermoacidophilic Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. **FEBS J.** **280**, 1126–1138.
- 214 Nishimasu, H., Fushinobu, S., Shoun, H. and Wakagi, T. (2006) Identification and Characterization of an ATP-Dependent Hexokinase with Broad Substrate Specificity from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus tokodaii*. **J. Bacteriol.** **188**, 2014–2019.
- 215 Soderberg, T. (2005) Biosynthesis of ribose-5-phosphate and erythrose-4-phosphate in archaea: a phylogenetic analysis of archaeal genomes. **Archaea** **1**, 347–352.
- 216 Ettema, T. J. G., Ahmed, H., Geerling, A. C. M., Oost, J. van der and Siebers, B. (2008) The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN) of *Sulfolobus solfataricus*: a key-enzyme of the semi-phosphorylative branch of the Entner–Doudoroff pathway. **Extremophiles** **12**, 75–88.

- 217 Kardinahl, S., Schmidt, C. L., Hansen, T., Anemüller, S., Petersen, A. and Schäfer, G. (1999) The strict molybdate-dependence of glucose-degradation by the thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius* reveals the first crenarchaeotic molybdenum containing enzyme – an aldehyde oxidoreductase. **Eur. J. Biochem.** **260**, 540–548.
- 218 Snijders, A. P. L., Walther, J., Peter, S., Kinnman, I., de Vos, M. G. J., van de Werken, H. J. G., Brouns, S. J. J., van der Oost, J. and Wright, P. C. (2006) Reconstruction of central carbon metabolism in *Sulfolobus solfataricus* using a two-dimensional gel electrophoresis map, stable isotope labelling and DNA microarray analysis. **PROTEOMICS** **6**, 1518–1529.
- 219 Camacho, M. L., Brown, R. A., Bonete, M., Danson, M. J. and Hough, D. W. (1995) Isocitrate dehydrogenases from *Haloferax volcanii* and *Sulfolobus solfataricus*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. **FEMS Microbiol. Lett.** **134**, 85–90.
- 220 Kouril, T., Esser, D., Kort, J., Westerhoff, H. V., Siebers, B. and Snoep, J. L. (2013) Intermediate instability at high temperature leads to low pathway efficiency for an in vitro reconstituted system of gluconeogenesis in *Sulfolobus solfataricus*. **FEBS J.** **280**, 4666–4680.
- 221 Liu, T., Hao, L., Wang, R. and Liu, B. (2013) Molecular characterization of a thermostable aldehyde dehydrogenase (ALDH) from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7. **Extremophiles** **17**, 181–190.
- 222 Bartolucci, S., Rella, R., Guagliardi, A., Raia, C. A., Gambacorta, A., De Rosa, M. and Rossi, M. (1987) Malic enzyme from archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. Purification, structure, and kinetic properties. **J. Biol. Chem.** **262**, 7725–7731.
- 223 Danson, M. J. (1988) Archaeobacteria: The Comparative Enzymology of Their Central Metabolic Pathways. In **Advances in Microbial Physiology** (Tempest, A. H. R. and D. W., ed.), pp 165–231, *Academic Press*.
- 224 Schönheit, P. and Schäfer, T. (1995) Metabolism of hyperthermophiles. **World J. Microbiol. Biotechnol.** **11**, 26–57.
- 225 Busca, G., Berardinelli, S., Resini, C. and Arrighi, L. (2008) Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. **J. Hazard. Mater.** **160**, 265–288.
- 226 Agarry, S. e., Durojaiye, A. o. and Solomon, B. o. (2008) Microbial degradation of phenols: a review. **Int. J. Environ. Pollut.** **32**, 12–28.
- 227 Sridevi, V., Lakshmi, M., Manasa, M. and Sravani, M. (2012) Metabolic pathways for the biodegradation of phenol. **Int J Eng Sci Adv Technol** **2**, 695–705.

- 228 Christen, P., Davidson, S., Combet-Blanc, Y. and Auria, R. (2011) Phenol biodegradation by the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* 98/2 in a fed-batch bioreactor. **Biodegradation** **22**, 475–484.
- 229 Christen, P., Vega, A., Casalot, L., Simon, G. and Auria, R. (2012) Kinetics of aerobic phenol biodegradation by the acidophilic and hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* 98/2. **Biochem. Eng. J.** **62**, 56–61.
- 230 Comte, A., Christen, P., Davidson, S., Pophillat, M., Lorquin, J., Auria, R., Simon, G. and Casalot, L. (2013) Biochemical, Transcriptional and Translational Evidences of the Phenol-meta-Degradation Pathway by the Hyperthermophilic *Sulfolobus solfataricus* 98/2. **PLoS ONE** (Driessen, A., ed.) **8**, e82397.
- 231 Lee, C. (Cy), Shallenberger, R. and Vittum, M. (1970) Free sugars in fruits and vegetables.
- 232 Lichtenthaler, F. W. (2000) Carbohydrates: Occurrence, Structures and Chemistry. In **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- 233 Grogan, D. W. (1989) Phenotypic characterization of the archaebacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. **J. Bacteriol.** **171**, 6710–6719.
- 234 Brouns, S. J. J., Walther, J., Snijders, A. P. L., Werken, H. J. G. van de, Willemen, H. L. D. M., Worm, P., Vos, M. G. J. de, Andersson, A., Lundgren, M., Mazon, H. F. M., et al. (2006) Identification of the Missing Links in Prokaryotic Pentose Oxidation Pathways EVIDENCE FOR ENZYME RECRUITMENT. **J. Biol. Chem.** **281**, 27378–27388.
- 235 Nunn, C. E. M., Johnsen, U., Schönheit, P., Fuhrer, T., Sauer, U., Hough, D. W. and Danson, M. J. (2010) Metabolism of Pentose Sugars in the Hyperthermophilic Archaea *Sulfolobus solfataricus* and *Sulfolobus acidocaldarius*. **J. Biol. Chem.** **285**, 33701–33709.
- 236 Brouns, S. J. J., Turnbull, A. P., Willemen, H. L. D. M., Akerboom, J. and van der Oost, J. (2007) Crystal Structure and Biochemical Properties of the d-Arabinose Dehydrogenase from *Sulfolobus solfataricus*. **J. Mol. Biol.** **371**, 1249–1260.
- 237 Vanhooren, P. T. and Vandamme, E. J. (1999) L-Fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** **74**, 479–497.
- 238 Kim, S. M., Paek, K. H. and Lee, S. B. (2012) Characterization of NADP+-specific L-rhamnose dehydrogenase from the thermoacidophilic Archaeon *Thermoplasma acidophilum*. **Extremophiles** **16**, 447–454.

- 239 LeBlanc, D. J. and Mortlock, R. P. (1971) Metabolism of d-Arabinose: a New Pathway in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** **106**, 90–96.
- 240 Baldomà, L. and Aguilar, J. (1988) Metabolism of L-fucose and L-rhamnose in *Escherichia coli*: aerobic-anaerobic regulation of L-lactaldehyde dissimilation. **J. Bacteriol.** **170**, 416–421.
- 241 Boronat, A. and Aguilar, J. (1981) Metabolism of L-fucose and L-rhamnose in *Escherichia coli*: differences in induction of propanediol oxidoreductase. **J. Bacteriol.** **147**, 181–185.
- 242 Obradors, N., Badía, J., Baldomà, L. and Aguilar, J. (1988) Anaerobic metabolism of the L-rhamnose fermentation product 1,2-propanediol in *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.** **170**, 2159–2162.
- 243 Petit, E., LaTouf, W. G., Coppi, M. V., Warnick, T. A., Currie, D., Romashko, I., Deshpande, S., Haas, K., Alvelo-Maurosa, J. G., Wardman, C., et al. (2013) Involvement of a Bacterial Microcompartment in the Metabolism of Fucose and Rhamnose by *Clostridium phytofermentans*. **PLOS ONE** **8**, e54337.
- 244 Yew, W. S., Fedorov, A. A., Fedorov, E. V., Rakus, J. F., Pierce, R. W., Almo, S. C. and Gerlt, J. A. (2006) Evolution of Enzymatic Activities in the Enolase Superfamily: L-Fuconate Dehydratase from *Xanthomonas campestris*†,‡. **Biochemistry (Mosc.)** **45**, 14582–14597.
- 245 Bae, J., Kim, S. M. and Lee, S. B. (2015) Identification and characterization of 2-keto-3-deoxy-L-rhamnonate dehydrogenase belonging to the MDR superfamily from the thermoacidophilic bacterium *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: implications to L-rhamnose metabolism in archaea. **Extremophiles** **19**, 469–478.
- 246 Cobucci-Ponzano, B., Trincone, A., Giordano, A., Rossi, M. and Moracci, M. (2003) Identification of an Archaeal α -L-Fucosidase Encoded by an Interrupted Gene PRODUCTION OF A FUNCTIONAL ENZYME BY MUTATIONS MIMICKING PROGRAMMED -1 FRAMESHIFTING. **J. Biol. Chem.** **278**, 14622–14631.
- 247 Cobucci-Ponzano, B., Conte, F., Benelli, D., Londei, P., Flagiello, A., Monti, M., Pucci, P., Rossi, M. and Moracci, M. (2006) The gene of an archaeal α -L-fucosidase is expressed by translational frameshifting. **Nucleic Acids Res.** **34**, 4258–4268.
- 248 Uhrigshardt, H., Walden, M., John, H., Petersen, A. and Anemüller, S. (2002) Evidence for an operative glyoxylate cycle in the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. **FEBS Lett.** **513**, 223–229.
- 249 Park, C. B. and Lee, S. B. (2000) Effects of exogenous compatible solutes on growth of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. **J. Biosci. Bioeng.** **89**, 318–322.

- 250 Park, C. B., Ryu, D. D. . and Lee, S. B. (2003) Inhibitory effect of l-pyroglutamate on extremophiles: correlation with growth temperature and pH. **FEMS Microbiol. Lett.** **221**, 187–190.
- 251 Wilson, H. and Cannan, R. K. (1937) The Glutamic Acid-Pyrrolidonecarboxylic Acid System. **J. Biol. Chem.** **119**, 309–331.
- 252 Alexander, B., Leach, S. and Ingledew, W. J. (1987) The Relationship between Chemiosmotic Parameters and Sensitivity to Anions and Organic Acids in the Acidophile *Thiobacillus Ferrooxidans*. **Microbiology** **133**, 1171–1179.
- 253 Baker-Austin, C. and Dopson, M. (2007) Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. **Trends Microbiol.** **15**, 165–171.
- 254 Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., Gambacorta, A., De ROSA, M. and Scandurra, R. (1991) Glutamate dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. **Eur. J. Biochem.** **196**, 459–467.
- 255 Schinkinger, M. F., Redl, B. and Stöffler, G. (1991) Purification and properties of an extreme thermostable glutamate dehydrogenase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. **Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.** **1073**, 142–148.
- 256 Marino, G., Nitti, G., Arnone, M. I., Sannia, G., Gambacorta, A. and Rosa, M. D. (1988) Purification and characterization of aspartate aminotransferase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. **J. Biol. Chem.** **263**, 12305–12309.
- 257 Schäfer, G., Engelhard, M. and Müller, V. (1999) Bioenergetics of the Archaea. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** **63**, 570–620.
- 258 Yokooji, Y., Sato, T., Fujiwara, S., Imanaka, T. and Atomi, H. (2013) Genetic examination of initial amino acid oxidation and glutamate catabolism in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. **J. Bacteriol.** **195**, 1940–1948.
- 259 Stickland, L. H. (1934) Studies in the metabolism of the strict anaerobes (genus *Clostridium*). **Biochem. J.** **28**, 1746–1759.
- 260 Nisman, B. (1954) THE STICKLAND REACTION. **Bacteriol. Rev.** **18**, 16–42.
- 261 Barker, H. A. (1981) Amino Acid Degradation by Anaerobic Bacteria. **Annu. Rev. Biochem.** **50**, 23–40.
- 262 Kunow, J., Linder, D. and Thauer, R. K. Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the sulfate-reducing Archaeoglobus fulgidus: molecular composition, catalytic properties, and sequence alignments. **Arch. Microbiol.** **163**, 21–28.

- 263 Mai, X. and Adams, M. W. (1996) Characterization of a fourth type of 2-keto acid-oxidizing enzyme from a hyperthermophilic archaeon: 2-ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase from *Thermococcus litoralis*. **J. Bacteriol.** **178**, 5890–5896.
- 264 Heider, J., Mai, X. and Adams, M. W. (1996) Characterization of 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductase, a new and reversible coenzyme A-dependent enzyme involved in peptide fermentation by hyperthermophilic archaea. **J. Bacteriol.** **178**, 780–787.
- 265 Mai, X. and Adams, M. W. (1994) Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. A new enzyme involved in peptide fermentation. **J. Biol. Chem.** **269**, 16726–16732.
- 266 Mai, X. and Adams, M. W. (1996) Purification and characterization of two reversible and ADP-dependent acetyl coenzyme A synthetases from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. **J. Bacteriol.** **178**, 5897–5903.
- 267 Neumann-Schaal, M., Hofmann, J. D., Will, S. E. and Schomburg, D. (2015) Time-resolved amino acid uptake of *Clostridium difficile* 630Δerm and concomitant fermentation product and toxin formation. **BMC Microbiol.** **15**, 281.
- 268 CISBIC Home. (2017) Centre for Integrative Systems Biology at Imperial College (CISBIC). Verfügbar unter <http://www.doc.ic.ac.uk/bioinformatics/CISBIC/>.
- 269 Valencia_UPV. (2017) FBA Analysis. Verfügbar unter http://2014.igem.org/Team:Valencia_UPV/Modeling/fba.
- 270 Utah State University. (2017) Flux Variability Analysis & Parsimonious Analysis. Verfügbar unter <https://systemsbiology.usu.edu/FVA.php>.
- 271 Libourel, I. G. L. and Shachar-Hill, Y. (2008) Metabolic Flux Analysis in Plants: From Intelligent Design to Rational Engineering. **Annu. Rev. Plant Biol.** **59**, 625–650.
- 272 Price, N. D., Famili, I., Beard, D. A. and Palsson, B. Ø. (2002) Extreme pathways and Kirchhoff's second law. **Biophys. J.** **83**, 2879–2882.